

Université de Sherbrooke

Étude sur la colonisation des tissus de porc par *Yersinia enterocolitica* et mise au point d'une épreuve ELISA pour détecter les porcs porteurs de cette bactérie.

Par

Valérie Thibodeau

Département de microbiologie et infectiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de maître ès science (M.Sc.) en microbiologie

Le 28 mars 2000



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-67332-4

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	II
1. GÉNÉRALITÉS SUR <i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i>	2
1.1 LES ENTÉROBACTÉRIES	2
1.2 L'ESPÈCE <i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i>	2
1.3 LA YERSINIOSE.....	3
2. ÉTAPES DE L'INFECTION PAR <i>Y. ENTEROCOLITICA</i>	5
2.1 L'ENTRÉE DANS L'HÔTE	5
2.2 LA COLONISATION BACTÉRIENNE	6
2.2.1 Colonisation du porc par les entérobactéries.....	7
2.3 FACTEURS DE VIRULENCE DE <i>Y. ENTEROCOLITICA</i>	8
2.3.1 Les toxines synthétisées par <i>Y. enterocolitica</i>	8
2.3.2 Le plasmide de virulence chez <i>Y. enterocolitica</i>	10
2.3.3 Les facteurs chromosomaux.....	12
3. IMMUNITÉ DE L'HÔTE CONTRE <i>Y. ENTEROCOLITICA</i>	13
3.1 IMMUNITÉ HUMORALE	14
3.2 IMMUNITÉ CELLULAIRE.....	15
3.3 INFECTION EXPÉRIMENTALE CHEZ LE PORC	15
4. ÉPIDÉMIOLOGIE.....	15
4.1 PRÉVALENCE DES SÉROTYPES DE <i>Y. ENTEROCOLITICA</i>	15
4.2 MODES DE TRANSMISSION.....	16
4.3 IDENTIFICATION DE <i>Y. ENTEROCOLITICA</i> ET TECHNIQUES RAPIDES DE DIAGNOSTIC.	16
4.3.1 Enrichissement	18
4.3.2 Milieu de culture sélectif en pétri	18
4.3.2 Identification.....	19
5. CONTRÔLE DE L'INFECTION.....	20
5.1 PROBLÉMATIQUE.....	20
5.2 HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS.....	20
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	21
ARTICLE 1 : STUDY OF THE COLONIZATION AND TISSUE DISTRIBUTION OF <i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i> FOLLOWING EXPERIMENTAL AND NATURAL INFECTIONS IN SWINE.....	22
ARTICLE 2 : DEVELOPMENT OF AN ELISA PROCEDURE TO DETECT SWINE CARRIERS OF PATHOGENIC <i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i>	44
REMERCIEMENTS.....	75
BIBLIOGRAPHIE.....	76

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Article 1

Presence of *Yersinia enterocolitica* in tissues of orally-inoculated pigs and the tonsils and feces of pigs at slaughter p.21

<i>Tableau 1.</i>	Distribution de <i>Yersinia enterocolitica</i> dans les tissus suite à une infection expérimentale de porcelets.....	p.36
<i>Tableau 2.</i>	Pourcentage de <i>Yersinia enterocolitica</i> isolées des amygdales et des fèces à l'abattoir.....	p.37
<i>Tableau 3.</i>	Observations histopathologiques suite à une infection expérimentale orale de porcelets.....	p.38

Article 2

Development of an ELISA procedure to detect swine carriers of pathogenic *Yersinia enterocolitica* at the slaughterhouse..... p.43

<i>Tableau 1.</i>	Spécificité de l'ELISA pour les sérotypes individuels de <i>Yersinia enterocolitica</i> O :3, O :5,27 et O :9.....	p.58
<i>Tableau 2.</i>	Spécificité de l'ELISA pour différentes entérobactéries avec le mélange de LPS.....	p.59
<i>Tableau 3.</i>	Réactions sérologiques spécifiques à chaque type de LPS de <i>Yersinia enterocolitica</i> chez le porc à l'abattoir.	p.60
<i>Figure 1.</i>	Cultures bactériennes d'amygdales et de matières fécales et réponse sérologique de cinq porcs suite à l'infection à <i>Yersinia enterocolitica</i>	p.61
Figure 2.	Évaluation de la distribution des titres d'anticorps par ELISA de porcs échantillonnés à l'abattoir.	p.63

Résumé

Étude sur la colonisation des tissus de porc par *Yersinia enterocolitica* et mise au point d'une épreuve ELISA pour détecter les porcs porteurs de cette bactérie.

Lors du premier volet de cette étude, nous avons observé les étapes précoces de l'infection chez les porcs par *Y. enterocolitica*, 42 porcelets de cinq semaines ont été inoculés per os avec approximativement 10^8 UFC/mL *Y. enterocolitica* O :3. Des groupes de cinq animaux ont été euthanasiés 30 minutes, 3, 6, 12, 24, 48 et 72 heures suivant l'infection. Les amygdales, nœuds lymphatiques et mésentériques, œsophage, duodénum, jéjunum, iléon, estomac, foie, rate et fèces ont été prélevés et analysés pour la présence de *Y. enterocolitica*. Cette bactérie a été retrouvée dans la plupart des sites après 30 minutes. *Y. enterocolitica* a aussi été isolé de la rate et du foie de 40 % des animaux à 30 minutes et 6 h postinfection mais pas plus tard, ce qui suggère une bactériémie transitoire lors des premières étapes de l'infection. Les amygdales sont colonisées chez 13 animaux sur 20 au total de 12 à 72 h postinfection, tandis que les fèces sont colonisées chez 4 animaux durant la même période. Un nombre maximal de 10^4 UFC de *Y. enterocolitica* par gramme d'amygdales et de fèces ont été isolés. Ces résultats ont été confirmés par la prise d'un gramme d'échantillon de fèces et d'amygdales sur 291 carcasses de porcs à l'abattoir. À la culture, 79 se sont révélés positifs pour la présence de *Y. enterocolitica*. Les résultats de cette étude démontrent que les amygdales sont très indicatifs d'une infection à *Y. enterocolitica* O :3 chez les porcs et que ce tissu devrait être enlevé lors du processus d'abattage afin de minimiser la propagation de ce microorganisme. Le deuxième volet de ce projet de recherche consistait en le développement d'une épreuve ELISA afin de détecter les anticorps contre les antigènes

lipopolysaccharidiques des trois sérotypes majeurs pathogène pour l'humain de porcs porteurs de *Y. enterocolitica* à l'abattoir. Le but de cette étude était de clarifier l'utilité d'un ELISA en examinant la séroconversion et la distribution dans les tissus de *Y. enterocolitica* suivant une infection expérimentale et à l'abattoir. Nous avons observé une séroconversion chez les animaux inoculés expérimentalement. Nous avons démontré que 27 % des porcs à l'abattoir sont porteurs de *Y. enterocolitica* dans leurs amygdales et/ou dans leur fèces et 66 % des porcs ont démontré des signes sérologiques d'infection précoce. À l'abattoir, 6 % des porcs étaient culture-positifs et séronégatifs ce qui indique une infection récente. Aussi, un nombre similaire de porcs démontrent une infection précoce par chacun des trois sérotypes de *Y. enterocolitica* testés, la majorité des cultures positives étaient de sérotype O:3. Cet ELISA est un bon outil de contrôle ; il peut, en conjonction avec la culture bactériologique, identifier les porcs infectés récemment à l'abattoir qui sont les plus à craindre pour la santé publique.

INTRODUCTION

1. Généralités sur *Yersinia enterocolitica*

1.1 Les Entérobactéries

La famille des *Enterobacteriaceae* est un groupe important d'espèces Gram-négatives, qui peuvent être mobiles ou immobiles, colonisant le tube digestif humain et animal: telles *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Yersinia*, etc. Ces bactéries peuvent être isolées aussi du sol, de l'eau et les matières en décomposition (Pelmont, 1993).

1.2 L'espèce *Yersinia enterocolitica*

Le genre *Yersinia* contient onze espèces dont trois sont des bactéries pathogènes pour l'humain soit: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica*. Ce dernier pathogène pour l'homme peut envahir les cellules humaines et animales (Acha et Szyfres, 1989). *Y. enterocolitica* est un coccobacille Gram-négatif, anaérobie facultatif, mobile à 25°C, ayant la caractéristique de se multiplier à 4°C (Leman et al., 1992). Cette dernière propriété peut expliquer le fait que la majorité des infections humaines surviennent davantage l'hiver et tôt le printemps quand les températures froides freinent la croissance des autres bactéries mais permettent la multiplication de *Y. enterocolitica* (Joklik et al., 1992). La réfrigération des aliments contaminés peut aussi permettre la multiplication sélective de ce microorganisme. Les réservoirs naturels de cette bactérie sont: les rongeurs, les oiseaux, les lapins et particulièrement les porcs (Leman et al., 1992). Aussi, ce microorganisme est souvent isolé de l'environnement marin (Black, 1993). Étant donné son omniprésence dans la nature, *Y. enterocolitica* infecte souvent les animaux. Ce pathogène peut

occasionnellement infecter l'humain suite à l'ingestion de nourriture (lait, porc) ou d'eau contaminée. Il est reconnu comme étant un agent causal d'empoisonnement alimentaire et de gastroentérite depuis les années 1960 (Murray, 1995). Il est donc important de privilégier de bonnes pratiques culinaires, comme la cuisson convenable de la viande de porc (Acha et Szyfres, 1989). De plus, sur la ferme, il est primordial d'avoir un bon programme d'hygiène, de désinfecter les parcs régulièrement et d'avoir une bonne méthode de drainage des matières fécales car l'intestin du porc semble être une source importante de *Y. enterocolitica*. Il a été rapporté plusieurs fois qu'il peut y avoir une contamination de la viande de porc (carcasses) par des matières fécales lors de l'éviscération, à l'abattoir (Leman et al., 1992).

1.3 La yersiniose

La yersiniose entérocolitique est une zoonose dont l'infection persiste pendant des périodes variant de quelques jours à des semaines. La plupart de ces infections restent localisées et sont auto-limitantes car la réaction inflammatoire de l'hôte parvient habituellement à éliminer la bactérie (Salyers et Whitt, 1994).

La maladie, chez l'humain, causée par *Y. enterocolitica* affecte surtout les enfants. Le symptôme prédominant est une entérite aiguë avec diarrhée profuse qui dure de trois à quatorze jours. Chez les adolescents, le syndrome pseudo-appendicite est souvent rencontré, avec douleur abdominale, fièvre et leucocytose. Chez les adultes, l'inflammation intestinale occasionne des douleurs abdominales et les infections extra-

intestinales sont fréquentes (Acha et Szyfres, 1989). Il y a 2 à 3% des malades qui développent des complications, comme par exemple l'arthrite réactive chronique qui peut atteindre une ou plusieurs articulations, ceci apparaissant de deux à six semaines après l'infection par le pathogène. Cette arthrite semble être provoquée par les lymphocytes T et les anticorps induits par une infection à *Y. enterocolitica*, qui génèrent une réaction auto-immune versus hôte chez les individus ayant l'allotype HLA-B27. Elle ne dépend pas d'infection bactérienne des articulations (Salyers et Whitt, 1994). Aussi, peuvent survenir l'érythème noueux, l'abcès au foie et à la rate, l'inflammation des nodules lymphatiques mésentériques, la pneumonie, la septicémie, etc. (Council for Agricultural Science and Technology, 1994).

À l'opposé de l'arthrite, certaines de ces complications impliquent la persistance bactérienne et nécessitent un traitement au triméthoprim-sulfaméthoxazole (Joklik et al., 1992).

La maladie chez l'animal est généralement causée par les sérotypes de *Y. enterocolitica* non pathogènes pour l'homme. Cette bactérie a été isolée chez plusieurs espèces d'animaux non-domestiqués, et dans un bon nombre de cas, on a observé des lésions intestinales ou des abcès hépatiques. Le porc, le chien et le chat peuvent avoir une importance marquée dans la pathogénie de l'infection puisque ces animaux vivent en proximité de l'homme et peuvent héberger des sérotypes qui infectent l'homme. L'infection chez les porcs est habituellement asymptomatique bien qu'à l'occasion, des

symptômes tels la fièvre, la diarrhée, l'amaigrissement des porcs, la présence de lésions intestinales ou les abcès hépatiques sont présents. On a aussi isolé l'agent chez des porcs cliniquement sains destinés à la consommation humaine. Il a été observé que dans les pays où l'incidence de la maladie humaine est élevée, on retrouve le plus grand nombre de porcs hébergeant les sérotypes pathogènes pour les humains (Acha et Szyfres, 1989).

Le processus de l'infection chez l'homme et le porc est sensiblement le même.

Y. enterocolitica infecte les porcs par voie orale, se multiplie et se retrouve dans les fèces deux à trois semaines après établissement de l'infection (Leman et al., 1992). Des études faites par Shiozawa et al. (1991) suggèrent que l'infection débute au niveau oral puis le pharynx et les amygdales avant de progresser vers l'intestin dans l'iléon et le colon.

2. Étapes de l'infection par *Y. enterocolitica*

2.1 L'entrée dans l'hôte

Y. enterocolitica entre dans l'organisme par les voies digestives lorsque l'eau et les aliments consommés sont contaminés. Cependant, l'entrée dans le système digestif est limité par un ensemble de défenses non-spécifiques tels, l'acidité gastrique, l'alcalinité de la bile intestinale, le péristaltisme, les surfaces muqueuses intestinales, la flore microbienne naturelle, etc. Les bactéries qui résistent à ces barrières naturelles peuvent poursuivre les étapes subséquentes de l'infection bactérienne des surfaces muqueuses intestinales (Murray, 1995).

2.2 La colonisation bactérienne

La colonisation bactérienne des surfaces muqueuses requiert l'établissement des bactéries à proximité de la muqueuse, la persistance des bactéries à la surface de celle-ci, l'acquisition d'éléments nutritifs essentiels pour leur croissance, un taux suffisant de multiplication leur permettant de maintenir ou d'augmenter leur population, et la résistance aux mécanismes de défense de l'hôte (Arp, 1988).

Les mécanismes par lesquels les bactéries se maintiennent à proximité des surfaces muqueuses sont de trois types: l'association, l'adhérence et l'invasion (Arp, 1988).

L'association est un attachement faible et réversible qui implique une localisation des bactéries le long de la surface épithéliale intestinale. Les bactéries s'associent aux sécrétions muqueuses par l'établissement d'un faible nombre de liens non-covalents entre les surfaces ou par chimiotactisme (Arp, 1988).

L'adhérence est un type d'attachement relativement stable et irréversible qui implique des molécules complémentaires spécialisées de la surface bactérienne (adhésines) et des surfaces muqueuses (récepteurs). Les cellules bactériennes et épithéliales produisent à leur surface un glycocalix de polysaccharides anioniques, qui contribue à la charge négative (hydrophobicité) de leur surface afin de permettre l'attachement irréversible. La dernière forme d'interaction dans le processus de colonisation bactérienne de la surface muqueuse est l'invasion. À cette étape, les pathogènes peuvent devenir intracellulaires en

pénétrant les cellules épithéliales et en s'établissant à l'intérieur de celles-ci, si leur mécanismes de virulence le permet (Arp, 1988).

2.2.1 Colonisation du porc par les entérobactéries

Quelques études ont été publiées au sujet de la colonisation des porcs par les entérobactéries. Comme mentionné précédemment, les entérobactéries vivent dans l'intestin. Très tôt après la naissance, l'intestin des mammifères devient contaminé par ce que l'on nomme la flore normale. Les entérobactéries qui font parties de la flore normale intestinale colonisent l'intestin. Le bas pH de l'estomac contribue à garder un compte bactérien peu élevé comparativement au compte bactérien dans le colon qui est très élevé. *E. coli* est un membre très important de cette famille de bactérie et est le plus grand responsable de problèmes de diarrhée chez les porcelets. Il y a 23% des porcelets examinés lors de cas de diarrhée qui sont infectés par *E. coli* entérotoxigène (ETEC). ETEC s'attache très facilement à la surface intestinale car il a un grand nombre d'adhésines à sa surface (Garabal et al., 1997). Il y a plusieurs autres exemples de colonisation par des entérobactéries. Smerdou et al., 1996 ont conclu qu'une colonisation de l'intestin d'un porcelet par *Salmonella typhimurium* X 4509 avirulent protège ce porcelet contre une infection gastrointestinale par certain virus (TGEV) en induisant une immunité systémique et mucosale aux antigènes de *S. typhimurium*. Il y a aussi d'autres études qui décrivent la colonisation de porcs par *Y. enterocolitica* dans les amygdales et dans l'intestin de porc (Nielsen et al., 1996, Shiozawa, 1991). D'ailleurs, ces deux derniers auteurs stipulent que la région des amygdales est certainement la plus

représentatives d'une infection par *Y. enterocolitica* et que celle-ci peut être colonisée longtemps durant l'infection. Toutefois, un nombre moindre de porcs sont porteurs au niveau intestinal ; la colonisation étant tardive et de plus courte durée dans l'infection.

2.3 Facteurs de virulence de *Y. enterocolitica*

L'invasion et la survie intracellulaire sont des aspects importants de la virulence des souches pathogènes de ce microorganisme (Joklik et al., 1992). Ces souches de *Y. enterocolitica* envahissent l'épithélium de l'iléon via les cellules lymphoépithéliales (cellules M) qui ont des récepteurs (intégrines) situés sur leur surface basolatérale. Les intégrines sont constituées de deux sous-unités (α et β) (Salyers et Whitt, 1994). Les bactéries gagnent ensuite les cellules lymphoïdes des plaques de Peyer situées dans la sous-muqueuse. Elles se multiplient dans la région des nodules lymphatiques mésentériques et y induisent une réaction inflammatoire. Les souches les plus virulentes qui causent une pseudo-appendicite, survivent et se multiplient dans une très grande partie des plaques de Peyer. Elles provoquent une réponse inflammatoire encore plus intense et peuvent se disséminer dans tout le corps (Joklik et al., 1992, Salyers et Whitt, 1994).

2.3.1 Les toxines synthétisées par *Y. enterocolitica*

On distingue deux groupes de toxines: les exotoxines, qui sont sécrétées à l'extérieur de la bactérie, et les endotoxines, qui sont partie intégrante de la paroi bactérienne et ne sont libérées qu'à la lyse de la bactérie. Exotoxines et endotoxines diffèrent par plusieurs propriétés (nature chimique, dénaturation par la chaleur, mode d'action, etc.) (Pelmont, 1993).

Les exotoxines sont de nature protéique et ont un mode d'action généralement très spécifique (Pelmont, 1993). La toxine Yst thermostable produite par *Y. enterocolitica* (semblable à la toxine STa produite par *Escherichia coli*) pourrait être responsable de quelques-uns des signes cliniques reliés à l'infection, tel la diarrhée (Salyers et Whitt, 1994). Cette entérotoxine est une molécule soluble dans le méthanol qui contient trois ponts disulfures essentiels à son activité biologique mais qui est composée de seulement treize acides aminés (Roth et al., 1995). Présentement, bien que sa structure chimique est connue, le rôle de l'entérotoxine reste encore à déterminer. Cependant, sa physicochimie, ses propriétés antigéniques et son mode d'action sont similaires à la toxine thermostable de *E. coli* (Joklik et al., 1992). Des études *in vitro* ont démontré que la production de la toxine s'effectue jusqu'à environ 26°C mais qu'elle n'est plus produite à des températures supérieures à 30°C. La séquence d'ADN codant pour la synthèse de l'entérotoxine Yst, se retrouve sur le chromosome bactérien et joue un certain rôle dans la pathogénicité de *Y. enterocolitica* (Davis et al., 1990).

Les endotoxines sont des complexes lipopolysaccharidiques de la paroi bactérienne qui ont un mode d'action généralement peu spécifique. Les endotoxines agissent à des doses plus fortes que les exotoxines (Pelmont, 1993). À 25°C, *Y. enterocolitica* forme des lipopolysaccharides (LPS) complets ou lisses sur sa membrane externe, mais à 37°C, les chaînes O des LPS deviennent incomplètes et les colonies ont alors une apparence rugueuse. Les protéines de la membrane externe (POMP) induisent alors des changements

à la surface cellulaire, qui augmentent la virulence de la bactérie (Davis et al., 1990). Les LPS sont des molécules complexes; ils sont composés d'un lipide A, d'un noyau oligosaccharidique et d'une chaîne polysaccharidique appelée antigène O. Cet antigène somatique confère la spécificité de la réponse sérologique et est utilisé pour le sérotypage de différents *Y. enterocolitica* (Skurnik et Toivanen, 1993). Les LPS seraient responsables de la résistance des bactéries au sérum de l'hôte en interférant avec la composante C5b-C9 du complément (Valvano, 1992).

Chez l'espèce *Y. enterocolitica*, en plus de ces antigènes somatiques O thermostables, il existe des antigènes flagellaires (péritriches) qui n'apparaissent que lorsque la bactérie est cultivée à basse température. Il est possible que quelques souches possèdent un antigène de surface capsulaire (Wauters et al., 1971).

2.3.2 Le plasmide de virulence chez *Y. enterocolitica*

Un des traits de virulence fondamental de cet entéropathogène est relié à la présence d'un plasmide de 75 kbp. Il est important de mentionner que plusieurs gènes de virulence de *Yersinia* sont régulés par la température. Le plasmide est associé à une variété de propriétés de surface cellulaire. Par exemple, les POMP sont des polypeptides formés à 37°C responsables d'augmenter l'hydrophobicité de la surface cellulaire dans le but de favoriser l'attachement aux cellules hôtes. Ensuite, à cette température, le plasmide contribue à la résistance à l'activité bactéricide du sérum, à la résistance à la phagocytose et aux radicaux libres d'oxygène; il permet aussi la prolifération intracellulaire dans les

macrophages (Davis et al., 1990). Les produits des gènes du plasmide de virulence forment quatre catégories différentes. Les protéines YadA (adhésine/invasine), les protéines antiphagocytaires excrétées (Yops), les protéines impliquées dans la synthèse et l'excrétion des Yops (Ysc), et les protéines de régulation (LcrV synonyme de antigène V) (Salyers et Whitt, 1994).

Les trois espèces pathogènes de *Yersinia* sont résistantes au sérum, c'est-à-dire qu'elles ne sont pas tuées par le complexe d'attaque membranaire (MAC) produit par l'activation du complément. Pour *Y. enterocolitica*, cette résistance est médiée par le facteur de virulence YadA. Celui-ci se lie au facteur H à la surface cellulaire et il en résulte que le C3b qui s'attache habituellement à la surface bactérienne, se lie plutôt au facteur H pour être ensuite dégradé (Salyers et Whitt, 1994). C'est ainsi que le facteur YadA entre en contact avec le complément.

Les Yops, les antigènes V et W sont des protéines de la membrane externe exprimées au maximum durant la croissance à 37°C en absence de Ca²⁺ à l'exception de Yop 1 qui est régulé seulement par la température. Cette protéine Yop 1 est, en fait, une protéine de haut poids moléculaire qui est responsable de la synthèse d'un réseau protéique dense à la surface bactérienne (Joklik et al., 1992).

Étant donné que *Y. enterocolitica* est tuée par les lymphocytes polymorphonucléaires (PMNs), une stratégie efficace serait d'éviter la phagocytose. C'est effectivement le rôle

principal des protéines Yops excrétées par la bactérie. Au lieu d'être excrétées dans le milieu extra-cellulaire durant l'infection, elles peuvent l'être directement dans le cytoplasme des cellules hôtes par les bactéries adhérentes. Les Yops peuvent être classées en deux groupes fonctionnels: celles qui interfèrent avec un signal de transduction de l'hôte (capacité de phagocyter) (gène *yop H* qui produit une tyrosine phosphatase) et celles qui attaquent le cytosquelette de la cellule hôte (gène *yop E*). Les protéines LcrV ou AgV sont essentielles à l'expression des Yops mais peuvent aussi jouer d'autres rôles du fait qu'elles sont excrétées dans le milieu extra-cellulaire et provoquent la synthèse d'anticorps (Salyers et Whitt, 1994).

2.3.3 Les facteurs chromosomaux

Des facteurs chromosomaux jouent un rôle dans l'invasion et la virulence de *Y. enterocolitica* (Davis et al., 1990). L'existence de deux gènes chromosomaux nécessaires à l'entrée de la bactérie dans la cellule a été démontrée. Le gène *inv* code pour une grande protéine de 108 kDa (invasine) qui est responsable de l'adhérence aux cellules hôtes dans le processus d'invasion. Le gène *ail* (attachement-invasion-locus) code pour un facteur d'entrée de 15 kDa. On comprend encore mal le rôle exact de ces protéines mais on reconnaît leur importance dans la pathogénicité de *Y. enterocolitica* (Joklik et al., 1992).

L'expression des protéines Ail et YadA est maximale à 37°C. Cependant, la production optimale de l'invasine se fait plutôt à 25°C. L'invasine est aussi synthétisée à 37°C, mais seulement si le pH est inférieur à 7; on peut donc retrouver l'invasine au niveau des

plaques de Peyer. L'invasine agirait donc comme facteur d'adhérence aux récepteurs des cellules M et activerait la phagocytose par ces cellules (Salyers et Whitt, 1994).

Deux autres traits de virulence ont été identifiés et leur expression est contrôlée par des gènes chromosomaux. Ce sont des protéines de hauts poids moléculaires localisées sur la membrane externe bactérienne et synthétisées seulement par les souches très pathogènes et sous conditions de carence en fer (Joklik et al., 1992). Dans ces conditions, plusieurs bactéries relâchent des sidérophores (chélateurs de fer à haute affinité) qui transportent le fer dans la bactérie via des récepteurs spécifiques de membrane (Davis et al., 1990). L'habileté à obtenir du fer à l'aide de sidérophores et le fait d'avoir un système de séquestration du fer (induit à 37°C) peut être considéré comme un facteur de virulence car la perte de cette habileté pour *Y. enterocolitica* entraîne une perte de virulence (Roth et al., 1995). Chez un individu normal, le fer est lié à différentes protéines dans le sang, comme par exemple la transferrine. Le fer n'étant pas sous forme libre, seules les souches ayant un mécanisme leur permettant l'acquisition de fer pourront produire une septicémie (Joklik et al., 1992).

3. Immunité de l'hôte contre *Y. enterocolitica*

Les composantes du système de défense gastro-intestinal sont: l'acidité gastrique, le système immunitaire intestinal, la flore bactérienne résidente, la forte concentration d'acides biliaires et enzymes digestives, le mucus et l'action péristaltique (Council For Agricultural Science and Technology, 1994).

Le système immunitaire intestinal peut réduire l'absorption de grandes molécules ou réduire la colonisation ou l'invasion de l'épithélium par des pathogènes sans en affecter la flore résidente. Les immunoglobulines présentes dans la salive sont aussi protectrices.

Dans la région iléale de l'intestin, où l'absorption est active, les ganglions mésentériques et les îlots lymphoïdes (plaques de Peyer) sont recouverts de cellules lymphoépithéliales (cellules M). Les particules antigéniques traversent la muqueuse épithéliale via les cellules M et sont retrouvées dans la sous muqueuse épithéliale où elles sont exposées aux lymphocytes T et B qui initient alors la réponse immunitaire (Council For Agricultural Science and Technology, 1994).

3.1 Immunité humorale

La réponse immunitaire humorale est essentiellement dirigée contre des envahisseurs extracellulaires ou exogènes. Ces envahisseurs sont détruits par des anticorps sécrétés par les lymphocytes B (Tizard, 1996). Ce sont les immunoglobulines A qui sont responsables de l'immunité locale intestinale. Les précurseurs des cellules à IgA abandonnent les plaques de Peyer par la voie lymphatique, se différencient en cellules IgA sécrétoires dans les ganglions mésentériques, gagnent le canal thoracique, puis migrent dans les ganglions intestinaux et la rate (Council For Agricultural Science and Technology, 1994).

3.2 Immunité cellulaire

Cette autre composante majeure du système immunitaire est plutôt dirigée contre des envahisseurs intracellulaires ou endogènes. Ces envahisseurs causant des anomalies cellulaires, ces dernières sont détruites par des cellules T cytotoxiques (Tizard, 1996).

3.3 Infection expérimentale chez le porc

Plusieurs infections expérimentales ont été réalisées dans le domaine porcin. Par exemple, Shiozawa et al, 1991 ont démontré que les amygdales sont une porte d'entrée principale pour *Y. enterocolitica* O :3 ; Maurelli et al., 1998 ont démontré le même phénomène pour *Salmonella choleraesuis*, un membre des entérobactéries pathogènes prévalent chez les porcs. Toutefois, le porc n'est pas un bon modèle animal pour étudier les Shigellose. Plusieurs études portent sur des infections expérimentales de porcelets avec *E. coli* pour prévenir la diarrhée (de Geus, 1998). Des infections expérimentales servent à la recherche de nouveaux médicaments pour traiter les pathologies porcines ayant de graves conséquences économiques alors que d'autres sont réalisées pour comprendre les pathologies humaines.

4. Épidémiologie

4.1 Prévalence des sérotypes de *Y. enterocolitica*

Il existe cinq biotypes ainsi que soixante-sept sérotypes basés sur les antigènes de surface O et soixante-sept basés sur les antigènes flagellaires H de *Y. enterocolitica* (Wauters et al., 1991). Les sérotypes O: 3 et O: 9 sont les plus retrouvés lors d'infections humaines en

Europe, au Japon, au Canada et le sérotype O: 8 est retrouvé plus fréquemment au États-Unis (Joklik et al., 1992). La répartition géographique est mondiale. Cependant, il y a une forte incidence dans plusieurs pays d'Europe, au Japon, en Afrique de Sud et au Canada. Les cas d'infections sont généralement sporadiques, malgré qu'il y ait eu quelques épidémies rapportées (Acha et Szyfres, 1989).

4.2 Modes de transmission

Il semble exister deux modes de transmission de la yersiniose. Premièrement, la voie fécale-orale comprend; soit par des fèces contaminés d'un porc à un autre porc ou bien par un environnement pollué, soit par des fèces contaminés d'un humain à un autre (épidémies familiales rapportées) (Leman et al., 1992). La deuxième voie est par l'ingestion de nourriture ou d'eau contaminée; par l'ingestion de viande de porc contaminée (Acha et Szyfres, 1989).

4.3 Identification de *Y. enterocolitica* et techniques rapides de diagnostic.

La culture de *Y. enterocolitica* peut habituellement être réalisée en 24 heures à partir de selles, du sang ou de nodules lymphatiques mésentériques de personnes malades ou d'animaux. Par la suite, le biotype et le sérotype peuvent être déterminés. Plusieurs méthodes d'enrichissement sélectif et milieux de culture pour l'isolement de *Y. enterocolitica* à partir de la nourriture sont décrites dans la littérature. *Y. enterocolitica* croît plus rapidement à 37°C qu'à 25°C mais une température plus basse est recommandée pour faire l'isolement primaire de cette bactérie (Murray, 1995).

Un test sérologique (ELISA) serait une bonne technique de diagnostic complémentaire. L'équipe de Nielsen, 1996, a étudié la réponse sérologique de porcs expérimentalement infectés par *Y. enterocolitica* O :3 à l'aide d'une épreuve ELISA. De plus, l'ELISA décrit dans cette étude détecte les sérotypes O :3, O :5,27 et O :9 de *Y. enterocolitica* qui sont pathogènes pour l'humain. L'ELISA ne serait pas qu'une bonne méthode de détection que pour *Y. enterocolitica*, mais aussi pour d'autres pathogènes alimentaires, tel *Salmonella typhimurium* chez le poulet (Hassan, 1990), *Toxoplasma gondii* chez le porc (Lind, 1997), *Brucella abortus* chez le bœuf (Limet, 1988) etc. Aussi, dans l'élaboration d'un tel test, il est important de considérer les réactions croisées entre *Brucella abortus* ou *B. suis* et *Y. enterocolitica* sérotype O:9 qui démontrent une parenté antigénique au niveau des lipopolysaccharides (LPS). Dans ce cas, on peut utiliser les antigènes flagellaires de *Y. enterocolitica* (Acha et Szyfres, 1989). De même, il y aurait similarité antigénique entre les LPS de la membrane externe de *Y. enterocolitica* et de *Vibrio cholerae* (Joklik et al., 1992).

L'utilisation d'une séparation immunomagnétique (IMS) suivie du PCR a été étudié comme méthode de détection rapide de *Y. enterocolitica* O :3 des tissus de porcs. Selon Rasmussen et al., 1995, le IMS-PCR peut être utilisé pour détecter *Y. enterocolitica* O :3 suite à un pré-enrichissement. Cependant, une détection directe de ce pathogène requiert une optimisation des procédures de préparation de l'échantillon à analyser. Bhaduri et al., 1998, ont mis au point une méthode simplifiée de préparation des échantillons provenant de la nourriture pour détecter *Y. enterocolitica* par PCR. Ils soutiennent que l'utilisation

d'écouvillons éliminent l'étape longue et rigoureuse d'extraction d'ADN, l'inhibition possible du PCR par l'ADN endogène de la nourriture, l'interférence causée par la flore normale du tissu récolté et la longue période de préparation des échantillons.

4.3.1 Enrichissement

Y. enterocolitica, un organisme psychrophile, est capable de se multiplier à 4°C et un enrichissement à cette température, pour deux à quatre semaines, est souvent utilisé pour isoler cette bactérie à partir d'échantillons polymicrobiens. Pour effectuer un enrichissement par le froid, le milieu utilisé peut être un simple tampon phosphate-saline (PBS). Cependant, cette longue période d'incubation étant inacceptable pour assurer la qualité de la nourriture, Doyle et Hugdahl (1983) ont utilisé une incubation de la bactérie dans du PBS pour un à trois jours à 25°C. D'autres procédés d'enrichissement impliquent des temps d'incubation plus courts à températures plus élevées en utilisant un milieu sélectif. Un bouillon Rappaport modifié (Wauters, 1971) a été utilisé, en Europe, pendant plusieurs années comme milieu de choix pour isoler les principaux sérotypes pathogènes de *Y. enterocolitica*.

4.3.2 Milieu de culture sélectif en pétri

Une gélose cefsulodin-irgasan-novobiocine (CIN) est un milieu sélectif et différentiel de choix pour *Y. enterocolitica*. Sur gélose CIN, toutefois, toutes les souches de *Yersinia* ont une apparence similaire, qu'elles soient pathogènes ou environnementales. Fukushima (1987) a donc développé un milieu sélectif pour l'isolement de *Y. enterocolitica* pathogènes (virulentes); la gélose VYE.

4.3.2 Identification

Il existe des trousse miniaturisées comme, par exemple, API 20E et le système Minitek (BBL) qui permettent une rapide identification de souches de *Y. enterocolitica* (Restaino et al., 1979). De plus, le biotypage, le sérotypage, des tests de virulence et biochimiques sont d'excellents outils pour différencier les souches pathogènes et environnementales. À partir de spécimens cliniques, il est aussi possible d'isoler *Y. enterocolitica* par culture sur gélose-sang ou sur milieu pour bactéries entériques tel gélose McConkey.

5. Contrôle de l'infection

5.1 Problématique

Les infections à *Y. enterocolitica* sont la cause d'un bon nombre d'infections entériques chez l'humain et la viande de porc est considérée comme une source importante de ce pathogène. La mise au point d'une épreuve sérologique permettant de détecter les animaux porteurs serait d'une grande utilité dans le contrôle de ce microorganisme pathogène. Toutefois, peu de données existent quant au processus de colonisation par *Y. enterocolitica* et à sa distribution et localisation dans les tissus du porc suite à l'infection.

5.2 Hypothèse et objectifs

Hypothèse: L'étude de la distribution bactérienne dans les tissus et dans les matières fécales et de la cinétique de production d'anticorps, nous permettra d'élaborer une technique ELISA qui sera utile dans le dépistage des porcs porteurs de *Y. enterocolitica* à l'abattoir.

Les objectifs spécifiques sont les suivants: Tout d'abord, déterminer les étapes de colonisation par *Y. enterocolitica* chez le porc. Ensuite, observer la distribution et la localisation bactérienne dans les tissus et dans les matières fécales du porc. Finalement, développer une épreuve ELISA pour détecter les porcs porteurs de *Y. enterocolitica* à l'abattoir. Une telle épreuve pourra être utile dans le cadre d'un modèle d'analyse des risques et de contrôle des points critiques (HACCP) comme stratégie de surveillance des infections par ce pathogène important dans l'industrie alimentaire.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Article 1 : Study of the colonization and tissue distribution of *Yersinia enterocolitica* following experimental and natural infections in swine

Thibodeau, V.*^{1,2}, E.H. Frost¹, S. Chénier² and S. Quessy²

¹ Department of Microbiology, Faculty of medicine
University of Sherbrooke, Sherbrooke, Canada

² Health Canada, Health of Animals and Food Laboratory, St-Hyacinthe, Canada

Corresponding author : Dr S. Quessy
3400 Casavant West, St-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 8E3
Tel. : 450-773-7730, Fax : 450-773-8152, e-mail : quessys@em.agr.ca

Abstract

In order to study the early events associated with infection of swine by *Yersinia enterocolitica*, forty-two, five week-old cross-bred piglets were inoculated per os with approximately 10^8 *Y. enterocolitica* O :3. Groups of five infected animals (and one negative control) were euthanized at 30 min, 3, 6, 12, 24, 48 and 72 hours following the infection. Tonsils, retropharyngeal and mesenteric lymph nodes, oesophagus, duodenum, jejunum, ileum, Peyer's patches, stomach, liver, spleen and feces from colon were collected and analysed for the presence of *Y. enterocolitica* by standard bacteriological procedures. Natural infections were also analysed, as a complementary study, by taking one-gram samples of fecal material and tonsils from 291 pig carcasses less than three hours after slaughter and culturing them for *Y. enterocolitica* using a cold enrichment technique. *Y. enterocolitica* O :3 was isolated at most sites at 30 min after infection. The presence of *Y. enterocolitica* in the liver and spleen of 40% of animals at 30 min and 3 h postinfection, but not at later times, probably indicated a transient bacteremia accompanying the initial stages of infection. The tonsils were probably colonized in most animals (13/20) as the bacteria remained present from 12 to 72 hours post-infection, while only 4 out of 20 fecal samples were found to be positive over the same period. Up to 10^4 colony forming units (CFU) of *Y. enterocolitica* per gram of tonsil and fecal material were recovered. Among the 291 animals sampled at the abattoir, 79 were found positive. It is therefore concluded that tonsils are the most reliable tissue for the indication of an infection/colonisation by *Y. enterocolitica* O :3 in swine and should be removed during the slaughter process in order to minimize the possibility of contamination of meat products.

Résumé

Dans le but d'étudier les étapes précoces de l'infection chez les porcs par *Yersinia enterocolitica*, quarante-deux porcelets de cinq semaines ont été inoculés per os avec approximativement 10^8 *Y. enterocolitica* O :3. Des groupes de cinq animaux (et un contrôle négatif) ont été euthanasiés 30 minutes, 3, 6, 12, 24, 48 et 72 heures suivant l'infection. Les amygdales, noeuds lymphatiques rétropharyngiaux et mésentériques, oesophage, duodénum, jéjunum, iléon (et plaques de Peyer), estomac, foie, rate et fèces (provenant du colon) ont été prélevé et analysé pour la présence de *Y. enterocolitica* par des procédures bactériologiques conventionnelles. L'infection naturelle a été examinée, pour confirmer les résultats de cette première étude, par la prise d'un gramme d'échantillon de fèces et d'amygdales sur 291 carcasses de porcs, moins de trois heures après l'abattage, suivi de la culture de ceux-ci pour *Y. enterocolitica* en utilisant une technique d'enrichissement par le froid. *Y. enterocolitica* O :3 a été retrouvé dans la plupart des sites déjà à 30 minutes. La présence de *Y. enterocolitica* dans le foie et la rate de 40% des animaux à 30 min et 6 h postinfection, mais pas plus tard dans l'infection, indique probablement une bactériémie transitoire qui accompagne les premières étapes de l'infection. Les amygdales étaient probablement colonisées chez la plupart des animaux (13/20) puisque la bactérie y a été retrouvée de 12 à 72 heures postinfection. Cependant, seulement 4 échantillons de fèces sur 20 ont été positifs durant la même période. Un nombre maximal de 10^4 UFC de *Y. enterocolitica* par gramme d'amygdales et de fèces a été isolé. Finalement, sur les 291 animaux échantillonnés à l'abattoir, 79 se sont révélés

positifs. Les résultats nous indiquent que les amygdales sont les tissus les plus indicatifs d'une infection à *Y. enterocolitica* O :3 chez les porcs et suggèrent que ce tissu doit être enlevé lors du processus d'abattage afin de minimiser les risques de contamination du produit par ce microorganisme.

Introduction

Y. enterocolitica O:3 is a worldwide emerging foodborne enteroinvasive pathogen associated with a wide spectrum of clinical and immunological manifestations. This microorganism is recognized as an important agent of diarrheal diseases and its incidence is equivalent to that of *Salmonella* and *Campylobacter* species in some countries (1, 2, 3, 4, 5). There are four major serovars that produce illness : in Europe O :3 and O :9 are predominant ; in Canada O :3 is the most commonly observed ; whereas in the United States O :8 and O :5,27 are most frequent (2, 3). Infection due to *Y. enterocolitica* O:3 is usually limited to a mild diarrhea with fever and abdominal pain but, in more severe cases, appendicitis-like syndromes or secondary complications such as reactive arthritis and septicemia can be observed (2, 4, 6). Recently, several cases of blood transfusion contaminated with *Y. enterocolitica* causing septic shock syndrome were reported with a 70% fatality rate (7, 8). Most *Y. enterocolitica* O:3 infections, however, are acquired by ingestion of contaminated food or water(2, 4, 7). Swine are the major reservoir for human pathogenic strains. Virulent strains of *Y. enterocolitica* O:3 were often found in the oral cavity and the gastrointestinal tract of pigs (1, 2, 11).

Studies have been undertaken to evaluate colonization at late times after experimental infection of swine with *Y. enterocolitica* (11, 12), however, data are missing concerning the early stages of colonization and invasion. Understanding the evolution of *Y. enterocolitica* infection in the natural host, in particular the distribution and quantification

of bacterial cells in tissues in the early stages of infection, is an important step in the development of control measures and diagnostic tools.

The aim of this work was to study the colonization and the distribution of *Y. enterocolitica* O:3 in tissues and fecal material following an experimental infection in swine. We were particularly interested in determining which tissue was the most indicative of an infection by *Y. enterocolitica* O:3 in this animal species.

Materials and methods

Yersinia enterocolitica O:3 inoculation strain

Pathogenic *Y. enterocolitica* biovar 4, O:3 was provided by Dr. Elroy Mann, Health of animals laboratory, Guelph, Ontario.

Preparation of the inoculum

The inoculation strain was prepared from one colony picked up from Columbia agar (Oxoid, Ontario) with 5% bovine blood which was inoculated into 10 ml of brain heart infusion broth (Quelab, Montréal) and incubated overnight at 37°C. From this culture, 3.3 ml were inoculated into 100 ml of brain heart infusion broth and incubated for 2 h 30 min at 37°C with agitation. When the optical density reached 0.6 at 540 nm, the final concentration of this culture was approximately 1×10^8 CFU *Y. enterocolitica* O:3. This inoculum was kept on the ice until used for inoculation within thirty min.

Experimental design

A total of 42, five week-old crossbred piglets, negative by throat swab and fecal culture for *Y. enterocolitica* were used. The infected animals (35) and the controls (7) were housed in two different pens to eliminate the risk of cross-infection between the inoculated and control animals. The animals were treated according to the guidelines of the Guide to the Care and Use of Experimental Animals from the Canadian Council on Animal Care.

The animals were inoculated orally by squirting the inoculum directly down the throat. Groups of five infected animals and one control animal were euthanatized 30 minutes, 3, 6, 12, 24, 48, 72 hours following the inoculation. Tonsils, retropharyngeal and mesenteric lymph nodes, oesophagus, duodenum, jejunum, ileum (and Peyer's patches), stomach, liver, spleen and feces from colon were collected and subjected to bacteriological examination, quantification of bacterial cells per gram of infected tissue and histopathological analysis.

Microbiological procedures

All tissues and fecal material were tested immediately and after twenty-one days of cold enrichment, according to the procedures of Nielsen et coll. (12). Briefly, one gram of each sample was placed in 9 ml (1:10) of phosphate buffered saline (PBS) (Oxoid BR 14 A) containing 2% sorbitol (Difco 0179-17-6) and 0.15% bile salts (Difco 0130-15-6), stomached 2 minutes and 1 ml was used for serial dilutions from 10^{-1} to 10^{-5} . After 3 hours of incubation at 25°C, 0.1 ml was plated on Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin (CIN) agar (CM 653 B and Yersinia supplement SR 109) and incubated aerobically for 18 hours at 28°C. Quantification was calculated from serial dilutions. Cold enrichment for twenty-one days was done using the remaining 9 ml and plated on CIN agar incubated for 18 hours at 28°C and examined for the presence of *Y. enterocolitica*.

Various biochemical tests such as triple sugar iron (TSI), urease, oxydase, rhamnose, sucrose, citrate and VP were performed to confirm the presence of *Y. enterocolitica*. Serotyping and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) were done to ensure that isolated strains were the same as the strain used for inoculation.

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

PFGE profiles of genomic DNA were determined for genetic comparison. Genomic DNA was isolated by a modified version of the method of Kaufmann and Pitt (13). In summary, many colonies of a pure overnight culture on blood agar were suspended in 75mM NaCl- 25mM EDTA (pH 7.5) (SE) to an optical density of 1.5 to 1.8 at 540nm. Then, 250 ul of this suspension was mixed with 250 ul of 1.5% low gelling temperature agarose (Sigma chemical co.) dissolved in SE. The mixture was kept at 56°C until it was dispensed into molds. After 10 min at 4°C, the solidified plugs were transferred to a bath containing 3.6 ml of 1% (w/v) N-lauryl sarcosine- 0.5M EDTA (pH 9.5) (Lysis Buffer). To this mixture, 0.4 ml of a 10 mg/ml solution of Proteinase- K (Sigma) dissolved in 50 mM Tris- 1mM CaCl₂ (pH 8.0) was added. Cell lysis was carried out for 20 h at 56°C. On the following day, the agarose plugs were washed with 10 mM Tris- 10 mM EDTA (pH 7.5) (TE) and stored at 4°C in this buffer. Digestion of agarose- embedded DNA was carried out with 20 U *Not* I (GibcoBRL) at 37°C for 18 to 24 hours (14, 15, 16). PFGE was performed with the Gene navigator system (Pharmacia Biotech inc.) using 1.2% high gelling agarose (Sigma Chemical co.)- Tris- borate EDTA 0.5X buffer gels in accordance with the manufacturer's instructions. The gel was run for 16 h at a constant voltage of 200V, pulse

time 5 to 25 sec with linear ramping, an electrical field angle of 120° and a temperature of 10°C.

The gels were stained with ethidium bromide, destained in distilled water and photographed on Type 667 Polaroid instant sheet film under UV illumination. A lambda ladder PFGE marker was purchased from Bio-Rad Laboratories.

Conventional histopathologic techniques

Tissues (tonsils, retropharyngeal and mesenteric lymph nodes, oesophagus, duodenum, jejunum, ileum (Peyer's patches), stomach, liver, spleen and colon) were taken from the euthanatized, infected and control animals and were fixed in 10% formalin solution. Tissues were then embedded in paraffin, and 3 µm sections were prepared with a microtome (Jung Autocut 2055). One section of each case was stained with hematoxylin-phloxin-saffron (HPS) for histologic examination.

Sampling at the abattoir

Two hundred ninety-one swine were sampled from different farms during the autumn of 1997 and the winter of 1998. One gram samples of palatine tonsils and feces were taken and analysed for the presence of *Y. enterocolitica*.

Serotyping

The isolated strains were serotyped by slide agglutination test with a commercial kit (Accurate chemical Co.) using specific O antiserum.

Results

Bacteriological study

In the first part of this study, animals were infected experimentally with *Y. enterocolitica* and sacrificed over the ensuing 72 h.

Not surprisingly, already at 30 min post-inoculation, *Y. enterocolitica* O :3 was recovered in palatine tonsils or colon of all animals (table I). Bacteria were also recovered at sites outside the digestive tract (liver or spleen) in four of the ten animals sacrificed over the first three hours, but in only one of the 25 animals sacrificed at later times. *Y. enterocolitica* was cultured frequently from the oesophagus or intestine during the first 24 h post-infection (16 of 25 animals), but rarely thereafter (2 of 10 animals), whereas bacteria were recovered frequently from the palatine tonsils both before (9 of 25 animals), and (8 of 10 animals) 24 h post-inoculation. The number of the CFU found in tissues ranged from 2.0×10^1 to 1.72×10^4 CFU per gram. All isolated strains at necropsy were analysed genetically by PFGE and all had the same genetic profile as the challenge strain. The control animals remained negative at necropsy for the presence of *Y. enterocolitica* in their tissues.

In the second part of this study, at the abattoir, among 291 animals sampled, 79 animals were positive for the culture of *Y. enterocolitica*. Seventy (24%) were found positive for culture of tonsils and in 17 (6%) fecal samples (Table II). Eight of the animals were positive both in their palatine tonsils and in their feces.

Histopathologic findings

A complete necropsy was performed on each animal of the experimental infection. No macroscopic lesions were observed. Histopathological lesions were observed in twenty-eight out of thirty-five infected animals. Lesions were not observed in the seven control animals. Most lesions were mild and located in palatine tonsils, colon and small intestine. *Y. enterocolitica* was not always isolated from the sites where small Gram-negative bacilli were observed (Table III).

The most significant lesions involved the presence of homogenous population of small Gram-negative bacilli colonizing the enterocytes in the striated border on villi of different segments of the small intestine, especially the ileum. Other inflammatory changes (neutrophils in the crypts, villus atrophy and crypt hyperplasia) were sometimes seen accompanying these lesions. Mild changes in other organs included the presence of similar bacteria in the crypts of palatine tonsils and a mild erosion of the superficial epithelium of the colon, sometimes accompanied by colonic gland hyperplasia and rarely by slight necrosis of the glandular epithelium (table III).

Discussion

We have observed the early events following inoculation of swine with *Y. enterocolitica*. Initially bacteria were found not only in the tonsils and digestive tract, but also in extra-intestinal sites such as the liver or spleen. Bacteria were cleared from extra-intestinal sites by 6 h post inoculation. Most animals cleared the bacteria from the digestive tract after 24 h, whereas infection of the tonsils persisted throughout the study period.

The presence of *Y. enterocolitica* at extra-intestinal sites following experimental infection has not been reported previously, no doubt because these studies did not examine animals early after infection (11, 12). In the present study, the liver and spleen were most likely seeded by bacteria which had entered the blood stream. Transient bacteremia is a well-known concept in human medicine and has been described following such simple procedures as tooth-brushing and might well have been induced in the present case by some minor trauma accompanying the ingestion of the bacterial bolus. An invasive microorganism, such as *Y. enterocolitica*, might not even require trauma, but could possibly gain access via either retropharyngeal or mesenteric lymph nodes. In transient bacteremia, the bacteria do not usually establish themselves (unless there are foreign bodies such as prosthetic heart valves) and are cleared by the host's natural defenses. Transient bacteremia would be of little consequence in swine, unless it occurred at the time of slaughter. The death of the animal might prevent clearance of the microorganism and result in widespread contamination of the carcass. In the hours immediately prior to

slaughter indeed, animals are particularly vulnerable to the initiation of the infection due to transportation, stress, hunger and resultant coprophagy, and crowding.

Our finding that gastrointestinal but not tonsillar infection was cleared by most animals within 48 h post-infection was supported by the detection of *Y. enterocolitica* in the tonsils of 24%, but in the feces of only 6%, of swine in a slaughterhouse and confirms the results of previous studies that identified this bacteria more frequently in tonsils than in feces (1, 3, 11, 20, 21, 22). Whether this reflects long-term colonization or recent infection will have to be investigated as the public health consequences of the latter might be even more significant than the already worrying high percentage of colonization.

Experimental infection analysed after weeks or months also showed *Y. enterocolitica* in the tonsils rather than in feces (11, 12, 17, 18, 19). It is already known that swine carry *Y. enterocolitica* in their tonsils for months after fecal excretion has stopped (3). Our results suggest that fecal excretion may stop soon after the ingestion of the bacteria. Moreover, since palatine tonsils were, in many pigs, the only tissue positive for the recovery of *Y. enterocolitica* O:3, it underlines the importance of the removal of this tissue during the slaughter process as it is currently performed in some countries (1, 3, 22).

The few histopathologic studies of infection of swine with *Y. enterocolitica* have reported similar results as ours. The most significant feature was the finding of micro-colonies of coccobacilli, accompanied by varying number of immune cells (23, 24). The clinical response to infection in piglets given a virulent strain of bacteria is related to the size of the inoculum (24). In our study, we decided to give a small dose of approximately 3×10^8 CFU of *Y. enterocolitica* that would provoke a subclinical response and be as near as possible to a natural infection. This explains why the lesions we observed were mild. In contrast, a dose of approximately 4×10^{10} CFU caused death and much more severe lesions (24).

Overall, the results presented here indicate that palatine tonsils are the most reliable tissue to identify an infection of *Y. enterocolitica* in swine and that colonization of this tissue occurs shortly after the infection. According to this finding, we propose that this tissue should be removed during the slaughter process to minimize the possibility of contamination of meat products.

Acknowledgments

We thank Louise Lessard and Ann Letellier for their excellent technical assistance.

TABLE I. Distribution and quantification of *Yersinia enterocolitica* in tissues following an experimental infection in piglets.

Tissues	Time						
	30 min.	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
Palatine tonsils	3/5 ^a (1.72 X10 ⁴ CFU)	1/5 (3.1X10 ³ CFU)	1/5 (10 CFU)	4/5 (2.5X10 ³ CFU)	1/5 (20 CFU)	3/5 (3.5X10 ³ CFU)	5/5 (1X10 ³ CFU)
Retropharyngeal lymph nodes	0/5	2/5 (1.1X10 ³ CFU)	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Oesophagus	1/5 (2.5X10 ³ CFU)	1/5 (1.7X10 ² CFU)	0/5	2/5	0/5	0/5	1/5
Stomach	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Liver	2/5 (4.1X10 ² CFU)	1/5 (2.4X10 ² CFU)	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Spleen	1/5 ^b	2/5 (3.6X10 ² CFU)	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5
Duodenum	1/5 (1.7X10 ² CFU)	0/5	2/5	0/5	0/5	0/5	1/5
Jejunum	1/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Ileum	0/5	0/5	1/5	1/5	0/5	0/5	0/5
Colon	2/5 (1.1X10 ² CFU)	2/5 (1X10 ⁴ CFU)	3/5 (1.16X10 ² CFU)	1/5	2/5	0/5	1/5
Mesenteric lymph nodes	2/5	1/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5

^a number of positive at culture/number infected (Colonies Forming Units (CFU) found in tissues)

^b not enough CFU to count

TABLE II. Percentage of *Y. enterocolitica* isolate from tonsils and feces at slaughterhouse

TISSUE	n ^a	%
Tonsils	70	24
Feces	17	6

^an= Number of positive isolates on a total of 291 samples

TABLE III. Histopathologic findings following an experimental oral infection in piglets.

Animal #	Lesions			Culture for <i>Y. enterocolitica</i>
	Palatine tonsils	Colon	Small intestine	
63 (30 min) ^h	-	+b c	+gd	+ (palatine tonsils)
69 (30 min)	+a	+b c	+gd	+ (colon)
108 (30 min)	-	-	+gd	+ (palatine tonsils, duodenum, liver, spleen, MLN ^f)
112 (30 min)	+a	-	+gd	+ (colon)
116 (30 min)	-	+b	+gd	+ (palatine tonsils, liver, MLN ^f , jejunum, oesophagus)
70 (3 h)	-	-	-	+ (palatine tonsils, oesophagus, RLN ^e , MLN ^f , colon)
72 (3 h)	+a	+c	-	+ (spleen)
73 (3 h)	+a	-	+gd	-
74 (3 h)	+a	-	-	+ (RLN ^e , liver, spleen, colon)
75 (3 h)	-	-	+gd	-
59 (6 h)	-	-	+gd	+ (palatine tonsils, colon)
60 (6 h)	+a	-	+g	-
64 (6 h)	+a	+b c	+gd	+ (colon, duodenum, ileum)
65 (6 h)	+a	+b	+g	+ (colon, duodenum, jejunum, stomach)
66 (6 h)	+a	-	+g	-
102 (12 h)	-	+b c	+d	+ (palatine tonsils, MLN ^f)
104 (12 h)	-	+b	+d	+ (oesophagus, palatine tonsils)
105 (12 h)	-	-	+g	+ (palatine tonsils, ileum)
106 (12 h)	+a	+b c	+gd	+ (colon, palatine tonsils)
103 (12 h)	-	-	-	+ (oesophagus)

58 (24 h)	-	+b	-	+ (colon)
68 (24 h)	+a	+b	+gd	-
110 (24 h)	+a	-	+gd	+ (colon)
113 (24 h)	-	-	-	+ (palatine tonsils)
117 (24 h)	-	-	+g	-
61 (48 h)	-	+b	+d	+ (palatine tonsils)
62 (48 h)	+a	+c	+d	-
67 (48 h)	-	+b	+gd	+ (palatine tonsils)
71 (48 h)	+a	-	+g	+ (palatine tonsils)
101 (48 h)	-	-	-	-
107 (72 h)	-	+b	+g	+ (palatine tonsils)
111 (72 h)	-	-	-	+ (palatine tonsils, colon, spleen)
114 (72 h)	-	-	+d	+ (palatine tonsils, duodenum, oesophagus)
115 (72 h)	-	+b	-	+ (palatine tonsils)
109 (72 h)	-	-	-	+ (palatine tonsils)
51 to 57 (control)	-	-	-	-

^a small Gram-negative bacilli in the crypts epithelium

^b superficial epithelium flattened or absent

^c glandular hyperplasia

^d necrosis of colonic glands epithelium with neutrophils in their lumen, crypt hyperplasia and villus atrophy

^e retropharyngeal lymph nodes

^f mesenteric lymph nodes

^g small Gram-negative bacilli in the enterocytes striated border on villi

^h (time postinfection)

References

1. **CRAIG A, KAPLAN B.** Swine pathogen emerges as human pathogen. J Am Vet Med Assoc. 1997 ; 210 : 880.
2. **DOYLE MP, CLIVER DO.** Foodborne diseases. Academic Press Inc. San Diego, California, 1990 : 224-228.
3. **KAPPERUD G.** *Yersinia enterocolitica* in food hygiene. Int. J. Food Microbio. 1991 ; 12 : 53-66.
4. **BOTTONE EJ.** *Yersinia enterocolitica* : The charisma continues. Clin Microbiol Rev 1997 ; 10 : 257-276.
5. **HOOGKAMP-KORSTANJE J.A., DE KONING J, SAMSON J.P.** Incidence of human infection with *Yersinia enterocolitica* serotype O :3, O :8 and O :9 and the use of indirect immunofluorescence in diagnostic. J. Infect. Dis 1986 ; 153 : 138-141.
6. **BRUBAKER RR.** Factors promoting acute and chronic diseases caused by *Yersiniae*. Clin Microbiol Rev 1991 ; 4 : 309-324.
7. **BLUMBERG HM, KIEHLBAUCH JA, WACHSMERTH IK.** Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* O :3 infections : use of chromosomal DNA restriction fragment length polymorphisms of RNA genes. J. Clin Microbiol. 1991 ; 29 : 2368-2374.
8. **CORNELIS G, LAROCHE Y, BALLIGAND G, SORY M.-P, WAUTERS G.** *Yersinia enterocolitica* a primary model for bacterial invasiveness. Rev. Infect. Dis. 1987 ; 9 : 64-87.
9. **IRIARTE M, CORNELIS GR.** Molecular determinants of *Yersinia* pathogenesis. Microbiologia Sem 1996 ; 12 : 267-280.
10. **MICHIELS T, WATTIAU P, BRASSEUR R, RUISSCHAERT J-M, CORNELIS G.** Secretion of Yop proteins by *Yersiniae*. Infection and Immunity 1990 ; 58 : 2840-2849.
11. **SHIOZAWA K, NISHINA T, MIWA Y, MORI T, AKAHANE S, ITO K.** Colonization in the tonsils of swine by *Y. enterocolitica*. Contrib Microbiol Immunol 1991 ; 12 : 63-67.

12. **NIELSEN B, HEISEL C, WINGSTRAND A.** Time course of the serological response to *Yersinia enterocolitica* O:3 in experimentally infected pigs. *Vet Microbiol* 1996 ; 48 : 293-303.
13. **KAUFMAN ME, PITT TL.** Methods in practical laboratory bacteriology. PFGE of bacterial DNA. CRC Press Inc, USA 1994 : 83-92.
14. **NAJDENSKI H, ITEMAN I, CARNIEL E.** Efficient subtyping of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1994 ; 32 : 2913-2920.
15. **BUCHRIESER C, WEAGANT SD, KASPAR CW.** Molecular characterization of *Yersinia enterocolitica* by pulsed-field gel electrophoresis and hybridization of DNA fragments to *ail* p YV probes. *Appl Environ Microbiol* 1994 ; 60 : 4371-4379.
16. **BUCHRIESER C, BUCHRIESER O, KRISTL A, KASPAR CW.** Clamped homogenous electric fields (CHEF) gel-electrophoresis of DNA fragments for comparing genomic variations among strains of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia spp.* *Zbl Bakt* 1994 ; 281 : 457-470.
17. **GAEDE K, MACK D, HEESEMANN J.** Experimental *Yersinia enterocolitica* infection in rats : analysis of the immune response to plasmid-encoded antigens of arthritis-susceptible Lewis rats and arthritis-resistant Fischer rats. *Med Microbiol Immunol* 1992 ; 181 : 165-172.
18. **FUKUSHIMA H, NAKAMURA R, ITO Y, SAITO K, TSUBOKURA M, OTSUKI K.** Ecological studies of *Yersinia enterocolitica* I. Dissemination of *Y. enterocolitica* in pigs. *Vet Microbiol* 1983 ; 8 : 469-483.
19. **FUKUSHIMA H, NAKAMURA R, ITO Y, SAITO K, TSUBOKURA M, OTSUKI K.** Ecological studies of *Yersinia enterocolitica* II. Experimental infection with *Y. enterocolitica* in pigs. *Vet Microbiol* 1984 ; 9 : 375-381.
20. **KWAGA J. K. P., IVERSEN J.O.** Laboratory investigation of virulence among strains of *Yersinia enterocolitica* and related species isolated from pigs and pork products. *Can. J. Microbiol.* 1992 ; 38 : 92-97.
21. **HARIHARAN H, GILES J.S., HEANEY S.B., LECLERC S.M., SCHURMAN R.D.** Isolation, serotypes, and virulence-associated properties of *Yersinia enterocolitica* from the tonsils of slaughter hogs. *Can J Vet Res* 1995 ; 59 : 161-166.

22. **ASPLUND K. TUOVINEN V., VEIJALAINEN P., HIRN J.** The prevalence of *Yersinia enterocolitica* O :3 in finnish pigs and pork. Acta vet. Scand. 1990 ; 31 : 39-43.
23. **FUKAI K., MARUYAMA T.** Histopathological studies on experimental *Yersinia enterocolitica* infection in animals. Contrib Microbiol Immunol 1979 ; 5 : 310-316.
24. **ROBINS-BROWNE RM, TZIPORI S, GONIS G, HAYES J, WITHERS M, PRPIC JK.** The pathogenesis of *Yersinia enterocolitica* infection in gnotobiotic piglets. J Med Microbiol 1985 ;19 : 297-308.

**Article 2 : Development of an ELISA procedure to detect swine carriers of
pathogenic *Yersinia enterocolitica***

Thibodeau, V.*1,2, E.H. Frost₁ and S. Quessy₂

- ₁ Département de Microbiologie et de Maladies Infectieuses, Faculté de médecine
Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada
₂ Health Canada, Health of Animals and Food Laboratory, St-Hyacinthe, Canada

Corresponding author : Dr. Sylvain Quessy

Address : 3400 Casavant Ouest, St-Hyacinthe, Québec, J2S 8E3.

Telephone number : (450) 773-7730

Fax number : (450) 773-8152

Abstract

An enzyme linked immunoassay (ELISA) was developed to detect antibodies in pigs against the lipopolysaccharide antigen of three major human pathogenic serotypes of *Yersinia enterocolitica*. Recent epidemiological evidence has demonstrated that pigs and pork are important sources of yersiniosis in humans. The purpose of this study was to demonstrate the use of an ELISA to detect swine carriers of this enteroinvasive bacteria by examining seroconversion and tissue distribution of *Y. enterocolitica* following experimental infection and then screening pigs at a slaughterhouse by bacterial culture and ELISA. It was observed that seroconversion occurred in animals experimentally inoculated with *Y. enterocolitica* but not with other enterobacteria. We demonstrated that 27% of swine at a slaughterhouse carried the bacteria in their tonsils and/or intestinal tract whereas 66% showed serological signs of previous infection. Six percent of swine at the slaughterhouse were culture-positive, but seronegative, indicating a recent infection. Although similar numbers of swine showed serological evidence of previous infection by each of the three *Y. enterocolitica* serotypes tested. Virtually all culture isolates were of serotype O :3. This ELISA is a good control tool in particular because it can, in conjunction with culture, identify recently infected pigs which are the most potential source of human infection.

Keywords : Pathogenic *Yersinia enterocolitica*; Swine ; ELISA

1. Introduction

Yersinia enterocolitica is an enteroinvasive foodborne pathogen that is recognized as an important cause of diarrheal disease in man (Craig and Kaplan, 1997, Doyle and Cliver, 1990, Kapperud, 1991, Bottone, 1997, Hoogkamp et al., 1986), with most infections caused by one of four serotypes : O :3, O :5,27, O :8 (only in United States), and O :9 (Doyle and Cliver, 1990, Kapperud, 1991). The infection caused by *Y. enterocolitica* is usually local and self-limited with diarrhea, fever and abdominal pain. However, in 3% of cases, complications such as appendicitis-like syndromes, reactive arthritis and septicemia can be observed (Doyle and Cliver, 1990, Bottone, 1997, Brubaker, 1991). Most human *Y. enterocolitica* infections are acquired by ingestion of contaminated food, especially pork or water (Doyle and Cliver, 1990, Bottone, 1997, De Boer and Nouws, 1991). Strains of *Y. enterocolitica* pathogenic for humans are often found in the oral cavity and the gastrointestinal tract of pigs (Craig and Kaplan, 1997, Doyle and Cliver, 1990, De Boer and Nouws, 1991, Shiozawa et al., 1991).

There are several detection methods for *Y. enterocolitica*, however, most are time consuming, and/or expensive. For example, culturing bacteria by cold enrichment, as recommended in Nordic countries (NCFA, 1987), takes at least four days for a positive diagnosis and 21 days for a negative diagnosis (Nielsen et al., 1996). Rapid PCR procedures for detecting *Y. enterocolitica* have been described, (Rasmussen et al., 1995) but not yet optimized for animal carcasses without enrichment by culture (Bhaduri and

Cottrell, 1998). The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) has emerged as one of the most rapid, inexpensive, sensitive and specific techniques for the quantitative detection of antibodies to bacterial components (Limet et al., 1988). ELISA procedures have been developed using the lipopolysaccharide (LPS) or outer membrane protein antigen of *Y. enterocolitica* to document seroconversion after experimental infection of swine (Shiozawa et al., 1991, Nielsen et al., 1996, Limet et al., 1988). As the LPS antigen defines the serotype, this ELISA was specific for only one serotype (Shiozawa et al., 1991, Nielsen et al., 1996), however, there is still no test available that could detect the three most prevalent pathogenic serotypes (O :3, O :5,27 and O :9) using the LPS or other antigen.

The aim of this work was to develop an ELISA for detecting antibodies against three different serotypes of *Y. enterocolitica* and to examine seroconversion and tissue distribution of *Y. enterocolitica* in the natural host following infection.

2. Materials and methods

2.1. Experimental design

Five week-old cross-bred piglets, negative by throat swab and fecal culture for *Y. enterocolitica* were used. The twenty infected animals were housed in a different pen from the ten controls. The animals were treated according to the guidelines of the Guide to the Care and Use of Experimental Animals from the Canadian Council on Animal Care.

The animals were inoculated orally by squirting the inoculum directly down the throat. The pigs were sampled over 56 days post-infection (p.i.). Fecal samples were collected on days 2,5,7,9,11,13, 15, 17, 19, 21, 25, 29, 33, 37, 43, 50, 56 p.i. and blood samples were collected once a week (from day 7 to day 56).

At necropsy (day 56), the palatine tonsils, retropharyngeal and mesenteric lymph nodes, oesophagus, duodenum, jejunum, ileum (and Peyer's patches), stomach, liver, spleen and feces (from colon) were collected and subjected to bacteriological examination and quantification of bacteria per gram of infected tissue.

2.2. *Y. enterocolitica* strains

Pathogenic *Y. enterocolitica* O:3 was provided by Dr. Elroy Mann, Health of animals laboratory, Guelph, Ontario. Pathogenic *Y. enterocolitica* O:5,27 and O:9 were provided by the Public Health Laboratory of Quebec, Ste-Anne de Bellevue, Quebec.

2.3.1 *Preparation of the inoculum.*

One colony of *Y. enterocolitica* O:3 was picked from Columbia agar (Oxoid, Ottawa, Ontario) with 5% bovine blood, inoculated into 10 ml of brain heart infusion broth (BHI) (Quelab, Montreal, Que.) and incubated overnight at 37°C. From this culture, 3.3 ml were inoculated into 100 ml of brain heart infusion broth and incubated 2.5 hrs at 37°C with agitation (100 rpm). The final concentration of this culture contained about 1×10^8

colony forming units (CFU) per ml. This relatively low dosage (1×10^8 CFU) was used in order to better represent natural infection in swine.

2.4. Microbiological procedure

All tissues and fecal material were tested immediately and after twenty-one days of cold enrichment, according to the procedures of Nielson et al., 1996.

2.5. Preparation of lipopolysaccharides (LPS)

LPS from *Y. enterocolitica* O:3, O:5,27 and O:9 were purified by the hot-phenol method as described by Westphal and Jann, 1965. The purity of the LPS antigen was verified by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. Coomassie blue stained gels appeared without protein bands while silver staining the gels revealed the typical ladder-like LPS pattern (Tsai and Frasch, 1982, Ayman et al., 1992, Ayman et al., 1991).

2.6. Antisera

Antisera were raised against the three major strains of *Y. enterocolitica* by intramuscular injection of 1 ml of an overnight culture in BHI broth twice a week for four weeks, to three pigs for each of three different serotypes of *Y. enterocolitica* (O:3, O:5,27, O:9) and also for fifteen other enterobacteria to test for cross-reactivity with other bacterial species. The negative control consisted of a pool of three sera obtained from pigs free of *Y. enterocolitica*.

2.7. *Sampling at the abattoir*

Two hundred ninety-one swine were sampled at the abattoir from different farms during the autumn of 1997 and the winter of 1998 (Thibodeau et al., 1999). They were approximately five month old. One gram samples of palatine tonsils and feces were taken and analysed for the presence of *Y. enterocolitica* (Nielsen et al., 1996). Sera were separated from blood samples taken from the heart and stored at -20°C until tested for antibodies by ELISA.

2.8. *Serotyping*

The strains isolated were serotyped by slide agglutination using a commercial kit (Accurate Chemical Co., Westbury, NY) with specific O antiserum.

2.9. *ELISA procedure*

An indirect ELISA was developed using a procedure similar to that reported by Chart, 1994. Purified LPS from *Y. enterocolitica* O:3, O:5,27 and O:9 were employed individually or pooled in an equimolar ratio and bound to Polysorp plates (Nunc, Naperville, IL) overnight at ambient temperature at 50 ng each per well in 100 μl of carbonate buffer (pH 9.6). The plates were blocked one hour at 37°C with 200 μl of a solution of PBS-Tween (20 mM phosphate-buffered saline (pH7.4) containing 0.05% Tween 20), 3% casein (Sigma Chemical, Oakville, Ont.) and then washed four times. Sera were diluted 1:100 in PBS-Tween and then 100 μl per well were incubated for one hour at

37°C, followed by four cycles of washing. The horseradish peroxidase-labelled immunoglobulin G fraction of goat antiserum raised against porcine IgG (Jackson Immuno Research Laboratories Inc., West Grove, PA.) diluted 1: 1500 in PBS-Tween was then added (100 µl) to each well. The conjugate was incubated for one hour at 37°C and washed as previously. The reaction was visualized using 2mM H₂O₂ and 0.4mM ABTS (2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (Sigma Chemical) in 50mM citrate solution (pH 5). Optical density was read at 540nm using an automated plate reader (LKB Biochrom, Ultrospec II, Canbridge, England). The cutoff was fixed at 0.2 O.D. units which was about three times the average O.D reading of sera from swine vaccinated with an enterobacteria other than *Y. enterocolitica*.

2.10. Statistical tests

The accordance between bacteriological and serological analysis of pigs at slaughter and of pigs in the experimental infection was measured by the Kappa test.

3. Results

3.1. ELISA procedure

In initial ELISA experiments with the purified individual LPS of different *Y. enterocolitica* serotypes bound to microwell plates at 50 ng/well, sera reacted only against the homologous serotype (Table I). When the LPS from the three serotypes were blended

together and bound at 50 ng each per well, a satisfactory signal was obtained from sera raised against each of the *Y. enterocolitica* serotypes (Table II).

Fifteen sera that were obtained from animals inoculated with enterobacteria reacted negatively in the ELISA with pooled LPS from *Y. enterocolitica*. The range of the O.D. values from these ELISA determinations was 0.023 to 0.160 while the average value was 0.067 with a standard deviation of 0.042. The average value for the control negative sera and for the sera raised against other enterobacteria were similar. These values were all lower than the cutoff which had been set at 0.2 O.D. units (table II).

3.2. *Experimental infection*

Twenty pigs, 5 week-old, were experimentally infected with a low dose of *Y. enterocolitica* and followed by culture and serology for eight weeks prior to necroscopy. All pigs remained clinically normal during the experiment. *Y. enterocolitica* was recovered from five pigs (feces from two pigs during the experiment, two pigs at necropsy and tonsils from three pigs at necropsy whereas all other organs examined were negative). *Y. enterocolitica* was not isolated from the fifteen other inoculated animals as well as nor from the control group (10 animals) at any time during the experiment.

All pigs that were positive for the presence of *Y. enterocolitica* in their tonsils and/or feces were also found positive by ELISA, whereas those negative for this bacteria were all seronegative as well. Seroconversion occurred between 21 and 56 days p.i. (Figure II). In

the two animals where fecal carriage was demonstrated prior to necropsy, seroconversion occurred two and six weeks later. In three animals where *Y. enterocolitica* was detected only at necropsy, seroconversion had occurred three to five weeks previously. The optical density values at necropsy varied from 0.230 to 0.550 with the two animals that showed fecal carriage prior to necropsy having the lowest values.

3.3. Screening at slaughterhouse

At the abattoir, of the 291 animals sampled, 79 were found positive for the culture of *Y. enterocolitica* (Thibodeau et al., 1999). We isolated the bacterium from the tonsils of 24% of the animals and from fecal samples of 6%. Eight animals (10%) were positive both in their tonsils and in their feces. Only 61 (77%) of the 79 animals culture-positive for *Y. enterocolitica* were found to be seropositive. In addition, 131 (62%) of the 212 culture-negative animals were seropositive (Figure II). The serotypes of *Y. enterocolitica* isolated from the 79 bacteriological positive animals were : O :3 (96%), O :5,27 (3%) and O :9 (1%). The two O :5,27 strains were in the tonsils and were seropositive while the O :9 isolate was in both tonsils and feces and was seropositive. Of the eight animals positive in both tonsils and feces, seven were seropositive (86%). Among the 62 animals that were positive only in the tonsils, 47 were seropositive (76%) and finally, of the nine animals that were positive only in the feces, four were seropositive (44 %).

In order to determine whether serology could distinguish the serotype of the infecting bacteria, all animals were tested against the individual LPS antigens rather than with the

pool that had been used in the screening (Table III). All animals positive with the mixed ELISA procedure were positive for one of the individual serotypes. None of the animals negative by the mixed ELISA were positive for an individual serotype. Similar numbers of animals had serological evidence of exposure to each of the *Y. enterocolitica* serotypes tested : 70 were seropositive to O :5,27, 63 to O :3 and 59 to O :9. This is in sharp contrast to the serotype identification of the isolates of which 96% were of serotype O :3. Despite the large number of animals seropositive to each individual serotype, no animal was seropositive simultaneously to two of the serotypes, although 12 animals were seropositive for either O :5,27 or O :9, while being positive by culture for serotype O :3.

The probability of a positive culture for *Y. enterocolitica* serotype O :3 was significantly higher for a seronegative animal (18 of 99) than for an animal seropositive for either O :5,27 or O :9 (12 of 129). Nearly 40% of culture-positive swine for O :3 were seronegative for O :3. Most (83%) of the animals with serological or culture evidence of infection with the O:3 serotype were still positive by culture, whereas only 3% of swine with past or present evidence of infection by another serotype were positive by culture for this serotype. Of the 76 animals colonized with an O :3 serotype, 12 had antibodies to *Y. enterocolitica* serotype other than O :3 but none of this group also had antibodies to O :3, whereas of the remaining 64 colonized hogs, 72% had antibodies to the colonizing O :3 serotype.

The sensitivity and specificity of serology for the O :3 antigen compared with culture positivity for this serotype were 61% and 92% respectively, whereas the corresponding

values for the ELISA against the pooled antigens of the three serotypes (mixed ELISA) versus culture positivity for any *Y. enterocolitica* serotype were 62% and 47%, respectively.

4. Discussion

In the present study we have developed an ELISA procedure capable of detecting, simultaneously, antibodies to each of the three major serotypes of *Y. enterocolitica* and then employed it to screen swine at a slaughterhouse in conjunction with conventional culture and analogous ELISA procedures directed at individual serotypes. We found 27% of slaughter hogs colonized with *Y. enterocolitica*. Our study also permitted us to determine that 66% of the animals had serological evidence of previous infection with this bacterium. Other studies (De Boer and Nouws, 1991, Shiozawa et al., 1991, Thibodeau et al., 1999, Hariharan et al., 1995) have noted the presence of *Y. enterocolitica* by culture of slaughtered animals, but have not attempted to measure previous exposure to this bacterium by serological means. Serology will not detect early infection, but rather identify late stages of infection and previous infections. On the other hand negative serology with positive culture identifies a recent infection and it is these recent infections that constitute the greatest public health threat. Of particular concern, we detected 18 animals (6%) which were culture positive but seronegative and thus may have been recently infected. We have shown previously (Thibodeau et al., 1999) that in the first

hours following infection with *Y. enterocolitica*, transient bacteremia may occur which could seed the entire carcasse if slaughter preceded the natural clearing of this bacteremia.

Not unlike other studies, we have also noted a preponderance of the serotype O :3 among *Y. enterocolitica* isolates from slaughter hogs (Rapperud, 1991, Hoogkamp et al., 1986, De Boer and Nouws, 1991). This is the first study however where serotype specific serology was applied. Our observation that similar numbers of animals have evidence of infection with each of the three serotypes studied, but that only the O :3 serotype is frequently found in culture could imply that infection with serotypes O :5,27 and O :9 occurred in younger animals than infections with serotype O :3 and thus have had the time to be cleared prior to slaughter. In our opinion the most logical explanation for our results is that infections with serotype O :3 gave rise to prolonged carriage whereas other serotypes are more efficiently cleared due to the particular virulence of the O :3 serotype.

It was surprising that, despite the observation that 66% of the swine at a slaughterhouse were seropositive to one serotype of *Y. enterocolitica*, none was positive to more than one serotype. Certainly some protection against O :3 was afforded by previous infection with other serotypes as was evidenced by the reduced rate of carriage in animals with antibodies to another serotype in comparison to animals without *Y. enterocolitica* antibodies. Thus, it is not likely that seroconversion following infection by an O :3 serotype in O :5,27 or O :9 seropositive animals was delayed by some form of immune tolerance. In our opinion, it is more likely that infection with an O :3 serotype in these

animals was controlled more rapidly than in animals naive to *Y. enterocolitica* and thus that the serological reaction to O :3 did not reach significant levels.

Previous longitudinal studies of experimental infection with *Y. enterocolitica* have used higher doses of inoculum directly into the stomach (Fukushima et al., 1984) or incorporated inoculum into food where it might continue to grow and obtain protection from gastric acidity (Nielsen et al., 1996). Both of these studies showed some animals culture positive in the feces already at 2 days and obtained maximal levels of excretion from five to fifteen days in almost all animals, whereas we only observed fecal carriage in four of 25 animals when a very low dose of inoculum was employed. This is probably a more natural time course of establishment of infection as non-infected animals housed in the same pen as experimentally infected swine showed fecal carriage only one or two weeks after their pen mates started excreting *Y. enterocolitica* (Fukushima et al., 1984). In both of these studies, fecal excretion persisted for about 3 to 5 weeks (Fukushima et al., 1984, Nielsen et al., 1996). After fecal excretion stopped, *Y. enterocolitica* could still be isolated from the tonsils of most animals (Nielsen et al., 1996). We and others (De Boer and Nouws, 1991, Shiozawa et al., 1991, Bhaduri and Cottrell, 1998) have also noted that pigs sampled at a slaughterhouse are positive for *Y. enterocolitica* more frequently in tonsils than in feces. This may represent a later stage in the colonization of swine with *Y. enterocolitica*. Indeed, antibodies were found more frequently in animals with bacteria in their tonsils than in those with fecal carriage. All studies of experimental

infection of swine with *Y. enterocolitica* have found antibodies in all infected animals at late times (Shiozawa et al., 1991, Nielsen et al., 1996, this study).

The mixed ELISA (Ag O :3, O :5,27, O :9) is a promising control method to detect infected herds and to distinguish newly infected from colonized pigs. It is important to identify recent infections as they are the most dangerous for public health. The mixed ELISA can screen the principal human pathogenic serotypes of *Y. enterocolitica*. It is sensitive, fast, inexpensive and demonstrated no cross reaction against a large range of enterobacteria.

Table 1

Specificity of ELISA reaction for individual serotypes of Y. enterocolitica O:3, O:5,27, and O:9

Sera raised		Lipopolysaccharides			
against (O.D)		Y.e O:3	Y.e O:5,27	Y.e O:9	
Y.e O:3		1 000	0,123	0,093	
Y.e O:5,27		0,100	0,503	0,080	
Y.e O:9		0,118	0,078	0,543	

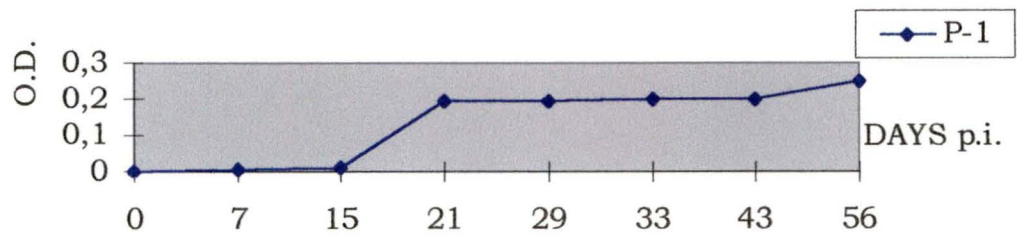
* The optical densities were measured at 540nm after ELISA reaction between sera raised against three strains of *Y. enterocolitica* (*Y.e.* O:3, *Y.e.* O:5,27, *Y.e.* O:9) and purified lipopolysaccharide of the corresponding strains.

Table 2
*Specificity of ELISA reactions with
pooled LPS for different
enterobacteria*

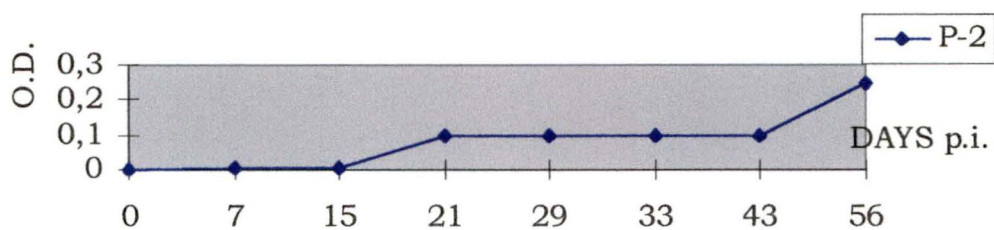
Sera	O.D.
Y.e O:3	0,996
Y.e O:5,27	0,500
Y.e O:9	0,530
Citrobacter freundii	0,036
E. coli	0,160
Enterobacter aerogenes	0,023
Klebsiella pneumoniae	0,039
Proteus mirabilis	0,031
Serratia marcescens	0,090
Yersinia kristensenii	0,040
Salmonella brandenberg	0,027
S. infantis	0,100
S. derby	0,113
S. schwartzengrund	0,043
S. urbana	0,108
S. senftenberg	0,079
S. krefeld	0,095
S. mbandaka	0,025
Average	0,067
Standard deviation	0,042

Table 3 : *Type specific serological reactions to Y. enterocolitica LPS antigens in slaughter pigs*

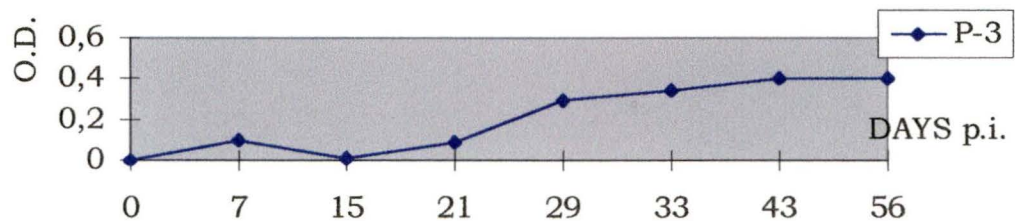
Culture and serological status	Number of animals	Serological reaction to individual LPS		
		O : 3	O : 5,27	O : 9
O : 3 isolate	76	46	7	5
O : 3 seropositive	46	46	0	0
O : 5,27 seropositive	7	0	7	0
O : 9 seropositive	5	0	0	5
Seronegative	18	0	0	0
O : 5,27 isolate	2	0	2	0
O : 9 isolate	1	0	0	1
No isolate	212	17	61	53
O : 3 seropositive	17	17	0	0
O : 5,27 seropositive	61	0	61	0
O : 9 seropositive	53	0	0	53
Seronegative	81	0	0	0



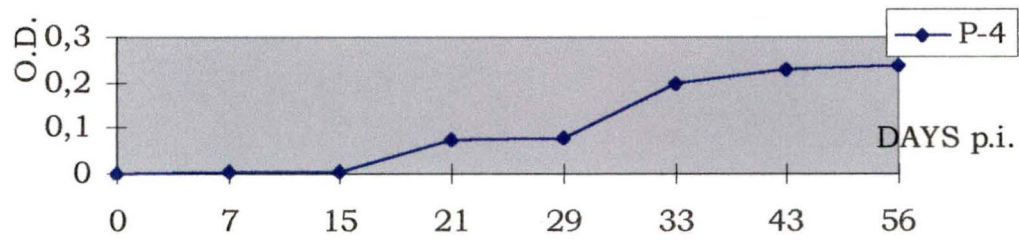
feces - + + + + + + +
 tonsils +



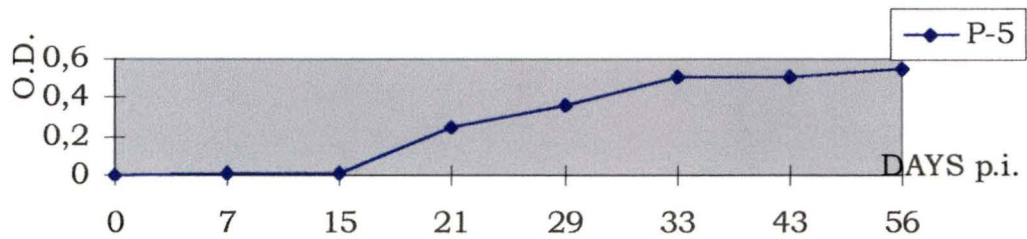
feces - +(13 p.i.) + + + + + +
 tonsils -



feces - - - - - - - +
 tonsils -



feces	-	-	-	-	-	-	-	-
tonsils								+



feces	-	-	-	-	-	-	-	+
tonsils								+

Fig. 1. Culture and serological responses of pigs to experimental infection with *Y. enterocolitica*. Five (P-1 to P-5) of twenty pigs experimentally infected with *Y. enterocolitica* showed a serological response (see panels above) or had this bacteria isolated from feces (cultured at eight time points) or tonsils (sampled at necropsy). Results are noted for each animal below the ELISA result for the appropriate sampling day.

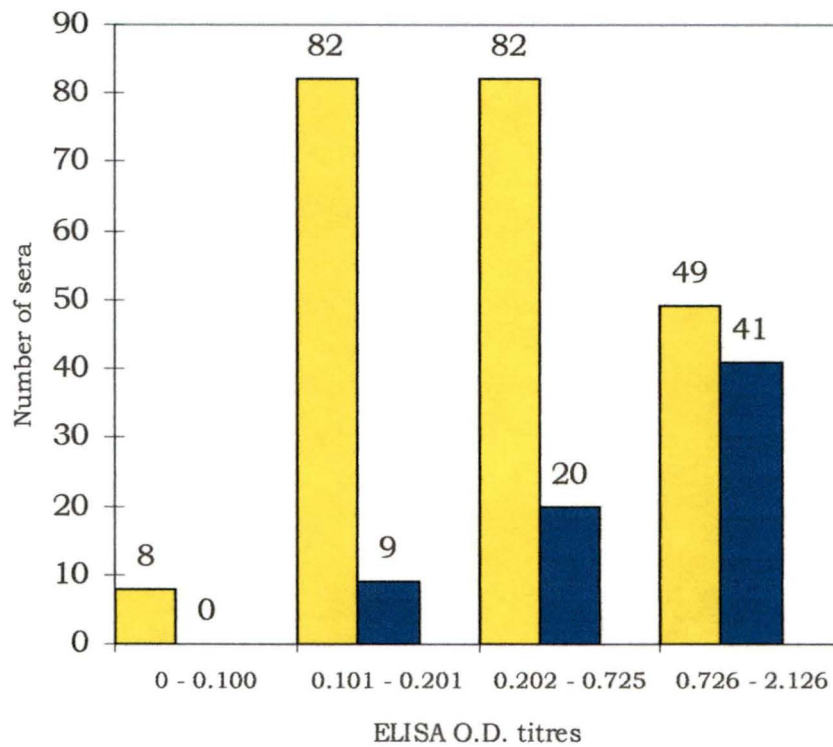


Fig. 2. Frequency distribution of optical density readings against *Y. enterocolitica* LPS as measured by ELISA in serum from swine sampled at a slaughterhouse. Yellow columns represent culture negative pigs and blue columns represent culture positive pigs.

Acknowledgments

We thank Louise Lessard and Ann Letellier for their excellent technical assistance.

References

- Ayman A.-H., Toivanen P, Skurnik M. The effect of growth temperature on the biosynthesis of *Yersinia enterocolitica* O :3 lipopolysaccharide : temperature regulates the transcription of the *rfb* but not of the *rfa* region. Microb. Pathogen. 1991 ; 10 : 81-86.
- Ayman A.-H., Toivanen P, Skurnik M. Lipopolysaccharide O side chain of *Yersinia enterocolitica* O :3 is an essential virulence factor in an orally infected murine model. Inf. Immun. 1992 ; 60 : 870-875.
- Bhaduri S, Cottrell B. A simplified sample preparation method from various foods for the PCR detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* : a possible model for other food pathogens. Mol. Cell Probes 1998 ; 12 : 79-83.
- Bottone EJ. *Yersinia enterocolitica* : The charisma continues. Clin Microbiol Rev 1997 ; 10 : 257-276.
- Brubaker RR. Factors promoting acute and chronic diseases caused by *Yersiniae*. Clin Microbiol Rev 1991 ; 4 : 309-324.
- Chart H. The use of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in bacteriology. Methods in practical laboratory bacteriology. CRC Press. Inc., U.S.A. 1994 ; 45-56.
- Craig A, Kaplan B. Swine pathogen emerges as human pathogen. J Am Vet Med Assoc. 1997 ; 210 : 880.
- De Boer E, Nouws JF. Slaughter pigs and pork as a source of human pathogenic *Yersinia enterocolitica*. Int J Food Microbiol. 1991 ; 12 : 375-378.
- Doyle MP, Cliver DO. Foodborne diseases. Academic Press Inc. San Diego, California, 1990 : 224-228.
- Fukushima H, Nakamura R, Ito Y, Saito K, Tsubokura M, Otsuki K. Ecological studies of *Yersinia enterocolitica* II. Experimental infection with *Y. enterocolitica* in pigs. Vet Microbiol 1984 ; 9 : 375-381.
- Hariharan H, Giles J.S., Heaney S.B., Leclerc S.M., Schurman R.D. Isolation, serotypes, and virulence-associated properties of *Yersinia enterocolitica* from the tonsils of slaughter hogs. Can J Vet Res 1995 ; 59 : 161-166.

Hoogkamp-Korstanje J.A., De Koning J, Samson J.P. Incidence of human infection with *Yersinia enterocolitica* serotype O :3, O :8 and O :9 and the use of indirect immunofluorescence in diagnostic. J. Infect. Dis 1986 ; 153 : 138-141.

Kapperud G. *Yersinia enterocolitica* in food hygiene. Int. J. Food Microbio. 1991 ; 12 : 53-66.

Limet JN, Kerkhofs P, Wijffels R, Dekeyser P. Le diagnostic sérologique de la brucellose bovine par ELISA. Ann. Méd. Vet. 1988 ; 132 : 565-575.

Nielsen B, Heisel C, Wingstrand A. Time course of the serological response to *Yersinia enterocolitica* O :3 in experimentally infected pigs. Vet Microbiol 1996 ; 48 : 293-303.

Rasmussen HN, Rasmussen OF, Christensen H, Olsen JE. Detection of *Yersinia enterocolitica* O :3 in faecal samples and tonsil swabs from pigs using IMS and PCR. J Appl Bacteriol 1995 ; 78 : 563-568.

Shiozawa K, Nishina T, Miwa Y, Mori T, Akahane S, Ito K. Colonization in the tonsils of swine by *Y. enterocolitica*. Contrib Microbiol Immunol 1991 ; 12 : 63-67.

Thibodeau V, Frost EH, Quessy S. Presence of *Yersinia enterocolitica* in tissues of orally- inoculated pigs and the tonsils and feces of pigs at slaughter. Can. J. Vet. Res. 1999; 63 : 96-100.

Tsai C.-M., Frasch CE. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharide. Anal. Biochem. 1982 ; 119 : 115-119.

Westphal O, Jann K. Bacterial lipopolysaccharide extraction with phenol-water and further application of the procedure. Met. Carb. Chem. 1965 ; 5 : 83-91.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les objectifs principaux des travaux réalisés dans ces études de maîtrise peuvent se résumer ainsi : En premier lieu, étudier de la colonisation et de distribution de *Y. enterocolitica* dans certains tissus de la région pharyngiale et du système gastro-intestinal du porc en parallèle avec l' étude de la prévalence de cette bactérie dans des tissus de porcs à l'abattoir. Dans un second volet, mettre au point une épreuve sérologique de type ELISA visant à détecter les porcs porteurs de *Y. enterocolitica* au niveau des abattoirs. La validation de cette épreuve ELISA nécessitait le suivi de la cinétique des anticorps après infection expérimentale. Ces études ont été réalisées dans le but de mettre sur pied de nouvelles stratégies de contrôle au niveau des abattoirs canadiens pour enrayer ou, du moins, réduire au minimum la contamination des carcasses de porcs qui sont les réservoirs majeurs de cet entéropathogène humain qu'est *Y. enterocolitica*.

Comme il est mentionné ci haut, dans le premier volet des travaux de recherche, nous avons observé les premières étapes de l'infection de porcs suite à l'inoculation d'une dose permettant une injection sous-clinique à *Y. enterocolitica* O :3, dans le but d'imiter le plus possible l'infection naturelle, ce qui n'avait jamais encore été rapporté dans la littérature.

Nous avons pu déterminer par cette expérience, que la bactérie apparaît dans l'animal simultanément au niveau des amygdales mais aussi dans le tractus digestif et dans certains tissus extra- intestinaux comme le foie et la rate. Cependant, seulement 6 heures suite à l'inoculation, ces mêmes tissus extra intestinaux deviennent exempts de toute trace de

bactérie. Tous les animaux observés dans cette étude se sont débarrassés de la bactérie de leur tube digestif. Pour ce qui est des amygdales, la bactérie a semblé persister tout au long de l'infection expérimentale qui a duré 72 heures. Selon nous, le fait que le foie et la rate aient été colonisés dans un court délai suite à l'inoculation des porcs et que cette colonisation n'ait pas persisté peut être attribué à une bactériémie transitoire qui est un concept bien connu en médecine humaine. Il repose sur le fait que la bactérie entre dans l'organisme par un foyer infectieux local et passe à la circulation sanguine et lymphatique, probablement par le biais des amygdales, étant donné le caractère invasif de *Y. enterocolitica* créant ainsi plusieurs foyers infectieux secondaires. Cependant, la bactérie ne parvient pas à s'établir dans les tissus grâce aux défenses immunitaires naturelles de l'hôte qui éliminent celle-ci. Ce principe de bactériémie transitoire n'a pas de lourdes conséquences pour le porc lui-même, mais il peut avoir des conséquences sur la santé publique si le porc se retrouve sur la ligne d'abattage. À ce moment, la mort de l'animal peut précéder l'élimination naturelle du microorganisme pathogène, ce qui peut contribuer fortement à la dissémination de la bactérie dans la carcasse. De plus, dans les heures avant l'abattage, l'animal est soumis à de multiples facteurs de stress qui accentuent sa vulnérabilité face à tous genres d'agressions extérieures donc la possibilité à se faire infecter par d'autres animaux déjà porteurs est accrue.

À l'abattoir, *Y. enterocolitica* est présent dans 24% des amygdales et seulement dans 6% des fèces des porcs. D'autres auteurs (Nielsen et al., 1996, Shiozawa et al., 1991) ont également observé que ce sont les amygdales les plus représentatives d'une infection à *Y.*

enterocolitica et non les fèces. De plus, il a été démontré qu'il en est de même pour *Salmonella choleraesuis* chez le porc (Maurelli, 1998). Pour cette raison il serait approprié de réactualiser les méthodes d'abattage actuelles qui comportent certaines lacunes pouvant compromettre la santé publique. Il est maintenant bien accepté que les porcs sont porteurs de *Y. enterocolitica* au niveau des amygdales et plusieurs études le prouvent par des infections expérimentales à long terme (Nielsen et al., 1996, Shiozawa et al., 1991). Suite à ces affirmations, il nous semble évident qu'il serait important d'enlever les tissus de la région pharyngiale lors du processus d'abattage comme cela est actuellement pratiqué dans quelques pays européens.

Dans la seconde partie des travaux, la mise au point d'une épreuve sérologique ELISA a été effectuée. Les études antérieures (Nielsen et al., 1996, Rasmussen et al., 1995) se concentraient sur un seul sérotype de *Y. enterocolitica* ; le O:3, mais d'autres sérotypes sont également pathogènes pour l'homme (Bottone, 1997, Craig et al, 1997, De Boer et al., 1991, Hoogkamp et al., 1986, Joklik et al., 1992). Nous avons développé un test qui permet de faire le sérodiagnostic des porcs positifs pour *Y. enterocolitica* de sérotypes O :3, O :5,27 et O :9 qui sont les plus prévalents au Canada dans les infections humaines. Cet ELISA indirect est basé sur des préparations de LPS purifiés par la méthode au phénol chaud initiée par Westphal et Jann, (1965) provenant de souches de *Y. enterocolitica* O :3, O :5,27 et O :9 qui sont mélangées par la suite dans une proportion égale. En premier lieu, nous avons étudié la cinétique de production d'anticorps par des porcs infectés expérimentalement avec *Y. enterocolitica* O :3, en parallèle avec des examens

bactériologiques de fèces de ces mêmes porcs. Chez tous les porcs infectés, nous avons observé une séroconversion. À la suite de l'obtention des résultats de cette expérience, nous avons pu effectuer une étude à l'abattoir pour vérifier la corrélation entre l'examen bactériologique des fèces et amygdales et l'analyse sérologique à l'aide du nouveau test ELISA. Cette étude a démontré, comme nous nous y attendions, que l'ELISA ne détecte pas les premières heures de l'infection étant donné l'absence d'anticorps dans l'animal. Cependant, l'ELISA combiné avec un examen bactériologique des amygdales s'avère très utile pour dépister des infections très récentes qui constituent le plus grand danger pour la santé publique étant donné la possibilité accrue de dissémination, dans plusieurs tissus de l'animal, de la bactérie à ce stade de l'infection.

À l'abattoir, nous avons trouvé 27% des porcs colonisés par *Y. enterocolitica*. Cette étude nous a aussi permis de déterminer que 66% de ces porcs montraient, au niveau sérologique, l'évidence d'une infection antérieure. D'autres études (Nielsen et al., 1996, Shiozawa et al., 1991) ont noté la présence de *Y. enterocolitica* par la culture de tissus d'animaux abattus, mais ils n'ont pas distingué les infections récentes de la colonisation par cette bactérie à l'aide d'examens sérologiques. Nous avons identifié 6% des animaux avec une culture positive et une sérologie négative ; animaux qui auraient donc été infectés récemment. Nous avons démontré, dans la première partie de nos travaux que dans les premières heures suivant le début de l'infection avec *Y. enterocolitica*, une bactériémie transitoire peut survenir. Ceci implique que le processus d'abattage devient alors une

source potentielle de propagation bactérienne de la carcasse, ce qui souligne l'importance de pouvoir discerner les infections récentes des infections tardives et/ou résolues.

Comme d'autres chercheurs (De Boer et al., 1991, Hariharan et al., 1995, Hoogkamp et al., 1986), nous avons noté une prépondérance du sérotype O :3 lors du sérotypage des cultures positives. Cependant, notre étude est la première à discuter de sérologie spécifique au sérotype de *Y. enterocolitica*. Nous avons observé qu'un nombre similaire d'animaux sont séropositifs à chacun des trois sérotypes étudiés, mais que seulement le sérotype O :3 est retrouvé à la culture des fèces et tissus. Ceci semble indiquer que la souche O:3 a la capacité de persister plus longtemps chez les animaux que les autres sérotypes, vraisemblablement grâce à sa virulence. Une autre explication possible à cette observation est que les sérotypes O :5,27 et O :9 infectent des animaux plus jeunes que le O :3 et que ces deux premiers sérotypes seraient éliminés avant l'étape d'abattage. Afin de pouvoir discerner entre ces deux possibilités, il faudra faire une étude chez les animaux plus jeunes.

Il est surprenant que malgré l'observation que 66% des porcs à l'abattoir sont séropositifs pour *Y. enterocolitica*, aucun animal ne fut séropositif pour plus d'un sérotype. Nous avons observé que 4% des animaux étaient séropositifs pour les sérotypes O:5,27 ou O:9 et positif en culture bactériologique. En fait, une certaine protection a été observée chez les animaux qui ont déjà été infectés par un des sérotypes de *Y. enterocolitica* car on retrouvait moins souvent une infection avec le sérotype O:3 que chez les animaux sans anticorps contre *Y. enterocolitica*. La séroconversion suivant une infection par O :3 chez

les animaux O :5,27 et O :9 séropositifs était probablement retardée par une certaine forme d'immunotolérance. Selon nous, l'infection avec le sérotype O :3 chez ces animaux est contrôlée plus rapidement que chez les animaux sans immunité à

Y. enterocolitica et, de ce fait, les réactions sérologiques à O :3 n'atteignent pas un niveau significatif. Il est possible qu'une production d'anticorps contre des épitopes de nature protéique puisse expliquer cette protection.

Notre étude, tout comme d'autres (Bhaduri et Cottrell, 1998, Hariharan et al., 1995, Nielsen et al., 1996, Shiozawa et al., 1991), a révélé que les porcs échantillonnés à l'abattoir sont plus fréquemment positifs au niveau des amygdales qu'au niveau des fèces. Aussi, les anticorps sont détectés plus souvent dans les animaux desquels la bactérie est isolée des les amygdales que ceux qui sont porteurs au niveau des fèces, tout comme il a été démontré pour *Salmonella choleraesuis* (Maurelli et al., 1998). Les entérobactéries pathogènes semblent avoir un profil sérologique similaire, comme dans le cas de *Salmonella typhimurium* (Hassan, 1990) et de *Brucella abortus* (Limet, 1988). De plus, toutes les études relatant des infections expérimentales avec *Y. enterocolitica* ont démontré la présence d'anticorps chez les animaux infectés à long terme suite à l'inoculation.

En conclusion, cet ELISA (O :3, O :5,27 et O :9), en conjonction avec la détection des antigènes, est une méthode importante et pratique pour dépister des animaux qui sont à leur étape critique d'infection et il peut s'avérer très utile de pouvoir distinguer les porcs

nouvellement colonisés car ce sont eux qui sont sans doute responsables d'une bonne partie de la propagation à l'abattoir et donc de la santé publique. Cette épreuve sérologique peut distinguer les infections des animaux colonisés par le pathogène depuis un certain temps. Cet ELISA possède l'avantage de pouvoir identifier les principaux sérotypes de *Yersinia enterocolitica* pathogènes pour l'humain. Donc, il sera un outil des plus pratique, en parallèle avec un test bactériologique rapide, pour identifier ces porcs porteurs. Nous pourrions alors, pour diminuer les risques, retirer les amygdales des animaux et placer les animaux les plus susceptibles d'être porteur de *Y. enterocolitica* entéropathogène pour l'humain à la fin de la chaîne d'abattage.

REMERCIEMENTS

Je remercie sincèrement mes deux directeurs de recherche Dr. Éric Frost de la Faculté de Médecine de l'Université de Sherbrooke et Dr. Sylvain Quessy de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal pour leur dévouement à l'égard de mon projet de recherche tant au niveau professionnel scientifique qu'au niveau personnel.

Je remercie Mme Louise Lessard et Mme Ann Letellier pour leur aide technique exceptionnelle et leurs bons conseils pratiques qui ont grandement favorisés la réalisation du projet de recherche.

Finalement, je remercie ma famille pour leur encouragement tout au long de ce projet de maîtrise.

BIBLIOGRAPHIE

Acha, P.N. et B. Szyfres. 1989. Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux 2ed. Office international des épizooties. Paris, France. pp. 207-227.

Arp, L.H. 1988. Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens. American Society for Microbiology. Washington D.C., USA. pp. 6-14 ; 250-251.

Bhaduri, S., Cottrell, B. A simplified sample preparation method from various foods for PCR detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* : a possible model for other food pathogens. Moll Cell Probes ;1998 :12 (2) : 79-83.

Black, J.G. 1993. Microbiology: Principles and Applications 2 ed. Prentice Hall Inc. New Jersey, USA. pp. 614, 737-756.

Council for Agricultural Science and Technology. 1994. Foodborne pathogens: risks and consequences. Library of Congress Cataloging Publication Data. Ames, USA. pp. 21-26 et 49-53.

Davis, D.B., R. Dulbecco, H.N. Eissen et H.S. Ginsberg. 1990. Microbiology 4 ed. J.B. Lippincott Company. Philadelphie, Pennsylvanie, USA. pp. 605-607.

De Geus, B. Harmsen, M., van Zijderveldf. Prevention of diarrhoea using pathogen specific monoclonal antibodies in an experimental enterotoxigenic *E. coli* infection in germfree piglets. V. et Q. 1998 ; 20 :S87-89.

Doyle, M.P., Hugdahl M.B. Improved procedure for recovery of *Yersinia enterocolitica* from meats. Appl Environ Microbiol. 1983 ; 45 : 127-135.

Fukushima, H., Nakamura, R., Ito, Y., Saito, K., Tsubokura, M., Otsuki, K. Ecological studies of *Yersinia enterocolitica* II. Experimental infection with *Yersinia enterocolitica* in pigs. Vet Microbiol 1984 ; 9 : 375-381.

Garabal, JI, Vazquez, F., Blanco, J., Blanco, M., Gonzalez, EA. Colonization antigens of enterotoxigenic *E. coli* strains isolated from piglets in Spain. Vet Microbiol. 1997 ; 54 : 321-328.

Hassan, JO., Curtiss, R. Control of colonization by virulent *Salmonella typhimurium* by orale immunization of chickens with avirulent delta cya delta crp *Salmonella typhimurium*. Res Microbiol. 1990 ; 141 : 839-850.

Joklik, W.K., H.P. Willett, D.B. Amos et C.M. Wilfert. 1992. Zinsser Microbiology 20 ed.

Appleton & Lange. Norwalk, Connecticut, USA. pp. 590-593.

Leman, et al. 1992. Disease of swine. Iowa State University Press. Ames, Iowa, USA. pp. 639-641.

Limet, J.N., Kerkhofs, P., Wijffels, R., Dekeyser, P. Le diagnostic sérologique de la brucellose bovine par ELISA. Ann Méd Vet, 1988 ; 132 : 565-575.

Lind, P. Hangegaard, J. Wingstrand, A., Henriksen, SA. The time course of the specific antibody response by various ELISAs in pigs experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. Vet Parasitol. 1997 ; 71 : 1-15.

Maurelli, AT., Routh, PR., Dillman, RC., Ficken, MD., Weinstock, DM., Almond, GW., Orndorff, PE. *Shigella* infection as observed in the experimentally inoculated domestic pig, *sus scrofa domestica*. Microb Pathog. 1998 ; 25 : 189-196.

Miller, V.L. 1996. Bacterial Invasiveness. Springer-Verlag. Berlin, Germany. pp. 1-19.

Mims, Cedrik., N. Dimmoch, A. Nash et J. Stephen. 1995. Mims Pathogenesis of Infectious Disease 4ed. Academic Press. San Diego, USA. pp. 28-31, 96-97, 237-239.

Murray, P. 1995. Manual of Clinical Microbiology 6 ed. American Society for Microbiology. Washington D.C., USA. pp. 446-455.

Nielsen, B., Heisel, C., Wingstrand, A. Time course of the serological response to *Yersinia enterocolitica* O :3 in experimentally infected pigs. Vet Microbiol. 1996 ; 48 : 293-303.

Pelmont, J. 1993. Bactéries et Environnement, Adaptation physiologique, Presse Universitaire Grenoble. pp. 35-40.

Rasmussen, H. N., Rasmussen, O.F., Christensen, H., Olsen, J.E. Detection of *Yersinia enterocolitica* O :3 in faecal samples and tonsils swabs from pigs using IMS and PCR. J Appl Bacteriol. 1995 ; 78 : 563-568.

Restaino, L., Jeter, W.S., Hill, W.M. Thermal injury of *Yersinia enterocolitica*. Appl Environ Microbiol. 1980, 40 : 939-949.

Roth, J.A., C.A. Bolin, K.A. Brogden, F.C. Minion et M.J. Wannemoenler. 1995. Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogenesis 2 ed. American Society for Microbiology. Washington D.C., USA. pp. 24-84.

Salys, A. et P. Whitt. 1994. Bacterial Pathogenesis a molecular approach. American Society for Microbiology. Washington D.C, USA. 214-226.

Shiozawa, K., Nishina, T., Miwa, Y., Mori, T., Akahane, S., Ito, K. Colonization in the tonsils of swine by *Yersinia enterocolitica*. Contrib Microbiol Immunol. 1991 ; 12 : 63-67.

Skumik, M., Toivanen, P. *Y. enterocolitica* lipopolysaccharide : Genetics and virulence. Trends Microbiol. 1993 ; 1 : 148-152.

Smerdou, C., Urniza, A., Curtis, R. III, Enjuanes, L. Characterization of transmissible gastroenteritis coronavirus S protein expression products in avirulent *S. typhimurium* delta cya delta crp : persistence, stability and immune response in swine. Vet Microbiol. 1996 ; 48 : 87-100.

Tizard, I.R. 1996. Veterinary Immunology, An Introduction, Fifth edition, W.B. Saunders Company ; pp. 276-277 ;286-287 ;296-297.

Valvano, M.A. 1992. Pathogenicity and molecular genetics of O-specific side-chain lipopolysaccharides of *Escherichia coli*. Can. J. Microbiol. 38: 711-719.

Wauters, G., L. Leminor et A.M. Chalon. Antigènes Somatiques et Flagellaires des *Yersinia enterocolitica*. Ann. Inst. Pasteur, Paris. 1971, 120: 631-642.

Westphal O, Jann K. Bacterial lipopolysaccharide extraction with phenol-water and further application of the procedure. Met. Carb. Chem. 1965 ; 5 : 83-91.